

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Avaliação de Propriedades Físico-Químicas e Funcionais de Leite
Processado por Tecnologia de Homogeneização a Ultra Alta
Pressão

MARCELO MONTEIRO PEDRAS

Engenheiro de Alimentos

PROF. DR. MARCELO CRISTIANINI

Orientador

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CAMPINAS – S.P., 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P342a Pedras, Marcelo Monteiro
Avaliação de propriedades físico-químicas e funcionais de leite
processado por tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão /
Marcelo Monteiro Pedras. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Marcelo Cristianini
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leite. 2. Leite - Proteínas. 3. Pressão alta (Tecnologia). 4.
Propriedades funcionais. 5. Homogeneização. I. Cristianini,
Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Evaluation of physical-chemical and functional properties
of milk processed by ultra high pressure homogenization
Palavras-chave em inglês (Keywords): Milk, Milk proteins, High Pressure (Technology),
Functional properties, Homogenization
Titulação: Mestrado em Tecnologia de Alimentos
Banca examinadora: Marcelo Cristianini
Salvador Massaguer Roig
Valdemiro Carlos Sgarbieri
Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Data de defesa: 07/02/2007
Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
(orientador)

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(membro da banca)

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(membro da banca)

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(membro da banca)

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."
Martin Luther King

De tudo ao meu amor serei atento
Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto
Que mesmo em face do maior encanto
Dele se encante mais meu pensamento.

Quero vivê-lo em cada vão momento
E em seu louvor hei de espalhar meu canto
E rir meu riso e derramar meu pranto
Ao seu pesar ou seu contentamento

E assim, quando mais tarde me procure
Quem sabe a morte, angústia de quem vive
Quem sabe a solidão, fim de quem ama

Eu possa me dizer do amor (que tive):
Que não seja imortal, posto que é chama
Mas que seja infinito enquanto dure.
Vinicius de Moraes

AGRADECIMENTOS

A minha esposa que foi sem dúvida meu porto seguro e a minha motivação em todos os momentos difíceis, inclusive como auxiliar em meus longos fins de semana no laboratório.

Aos meus pais que sempre me apoiaram incondicionalmente e que me despertaram desde cedo a curiosidade e a vontade de aprender.

Ao meu orientador e acima de tudo meu amigo Marcelo Cristianini, pelo tato e inspiração em cada percalço deste trabalho.

Aos amigos e colaboradores do laboratório que me ajudaram muito a desenvolver este trabalho. Em especial a Judite, José Roberto, Mark e Claudia, pessoas maravilhosas que tiveram a paciência e dedicação em me instruir.

Aos vários funcionários da FEA que me ajudaram a conseguir os meios para realizar a pesquisa: Karla, Beth, Renata, Ana, Priscila e Alessandra.

Ao Professor Ronei e Alessandra Borin que gentilmente me permitiram utilizar as instalações do IQ.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS	XVII
RESUMO GERAL	XIX
GENERAL SUMMARY	XXI
INTRODUÇÃO GERAL	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
1. O leite e sua composição	07
2. Proteínas do leite e propriedades funcionais	09
2.1. Solubilidade	10
2.2. Aeração	11
2.3. Emulsificação	12
3. O processamento de ultra alta pressão	12
4. Efeitos do tratamento de ultra alta pressão em leite	14
4.1. pH.....	15
4.2. Estabilidade a precipitação por álcool	15
4.3. Luminosidade	16
4.4. Hidrofobicidade	17
4.5. Viscosidade	17
5. Efeitos do tratamento de alta pressão nos constituintes do leite	18
5.1. Gordura	18
5.2. Lactose.....	19
5.3. Sais	19
5.4. Enzimas.....	20
6. Proteínas do leite tratado por ultra alta pressão	20
6.1. Caseína	22
6.2. Proteínas do soro	25
7. Propriedades funcionais e tratamento de ultra alta pressão	27
7.1. Solubilidade.....	28
7.2. Aeração	29
7.3. Emulsificação	29

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
--	-----------

CAPÍTULO 1 – EFEITO DO PROCESSAMENTO DE HOMOGENEIZAÇÃO A ULTRA ALTA PRESSÃO (HUAP) NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LEITE.....	39
--	-----------

RESUMO.....	41
--------------------	-----------

SUMMARY.....	43
---------------------	-----------

1. Introdução.....	45
---------------------------	-----------

2. Materiais e Métodos	47
-------------------------------------	-----------

2.1. Matéria-prima	47
--------------------------	----

2.2. Processamento do Leite.....	47
----------------------------------	----

2.3. Determinação da composição centesimal	48
--	----

2.4. pH.....	48
--------------	----

2.5. Estabilidade ao álcool.....	48
----------------------------------	----

2.6. Luminosidade	49
-------------------------	----

2.7. Desnaturação de Proteínas do Soro	49
--	----

2.8. Hidrofobicidade	50
----------------------------	----

2.9. Viscosidade	51
------------------------	----

2.10. Tratamento de dados	51
---------------------------------	----

3. Resultados e Discussão	53
--	-----------

3.1. Processamento do Leite.....	53
----------------------------------	----

3.2. Determinação da composição centesimal	55
--	----

3.3. pH.....	55
--------------	----

3.4. Estabilidade ao álcool.....	57
----------------------------------	----

3.5. Luminosidade	59
-------------------------	----

3.6. Desnaturação de Proteínas do Soro	62
--	----

3.7. Hidrofobicidade	67
----------------------------	----

3.8. Viscosidade	70
------------------------	----

4. Conclusões	73
----------------------------	-----------

5. Referências Bibliográficas	75
--	-----------

CAPÍTULO 2 – PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE CASEÍNA OBTIDA A PARTIR DE LEITE PROCESSADO POR HOMOGENEIZAÇÃO A ULTRA ALTA PRESSÃO (HUAP).	81
--	-----------

RESUMO.....	83
--------------------	-----------

SUMMARY.....	85
---------------------	-----------

1. Introdução	87
2. Materiais e Métodos	89
2.1. Matéria-prima	89
2.2. Processamento do Leite	89
2.3. Obtenção da caseína	89
2.4. Liofilização	90
2.5. Determinação da composição centesimal	90
2.6. Solubilidade	91
2.7. Aeração	91
2.8. Emulsificação	93
2.9. Tratamento de dados	95
3. Resultados e Discussão	97
3.1. Processamento do Leite	97
3.2. Determinação da composição centesimal de caseína liofilizada	97
3.3. Solubilidade	99
3.4. Aeração	100
3.5. Emulsificação	104
4. Conclusões	109
5. Referências Bibliográficas	111
 CAPÍTULO 3 – PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS DO SORO OBTIDAS A PARTIR DE LEITE PROCESSADO POR HOMOGENEIZAÇÃO A ULTRA ALTA PRESSÃO	 115
RESUMO	117
SUMMARY	119
1. Introdução	121
2. Materiais e Métodos	125
2.1. Matéria-prima	125
2.2. Processamento do Leite	125
2.3. Obtenção das proteínas do soro	125
2.4. Liofilização	126
2.5. Determinação da composição centesimal	126
2.6. Solubilidade	127
2.7. Aeração	127
2.8. Emulsificação	129
2.9. Tratamento de dados	131
3. Resultados e Discussão	133
3.1. Processamento do Leite	133

3.2. Determinação da composição centesimal de proteínas do soro liofilizadas	133
3.3. Solubilidade	134
3.4. Aeração	135
3.5. Emulsificação	140
4. Conclusões	145
5. Referências Bibliográficas	147
CONCLUSÕES GERAIS	151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alterações nas micelas de caseína durante e após processamento de alta pressão isostática	23
Figura 1.1: Nível de precipitação	49
Figura 1.2: Correlação entre variação de pressão (ΔP) e variação de temperatura (ΔT) durante o processamento de leite desnatado por HUAP	54
Figura 1.3: Luminosidade de leite processado por HUAP	60
Figura 1.4: Determinação de Nitrogênio Não Caséico (NNC) em leite desnatado processado por HUAP	62
Figura 1.5: Sobrenadante e precipitado obtidos no processo de obtenção da caseína e proteínas do soro em leite processado por HUAP	66
Figura 1.6: Turbidez (Haze) do soro obtido pela acidificação a pH 4.6 de leite processado por HUAP	66
Figura 1.7: Fluorescência de leite processado em HUAP em diferentes concentrações de ANS em solução	67
Figura 1.8: Fluorescência de leite processado em HUAP com concentração ótima de ANS (100 μ mol/L)	68
Figura 1.9: Fluorescência máxima (F_{max}) de leite processado como percentual relativo ao leite sem processamento	69

Figura 1.10: Viscosidade de leite processado em diferentes níveis de HUAP	70
Figura 2.1: Sobrenadante e precipitado obtidos no processo de obtenção da caseína.....	90
Figura 2.2: Capacidade de Formação de Espuma (CFE) de caseína obtida a partir de leite processado por HUAP	100
Figura 2.3: Variação do volume de espuma formada por caseína obtida de leite desnatado processado por HUAP	102
Figura 2.4: Estabilidade da Espuma (EE) formada por caseína obtida de leite desnatado processado em HUAP	103
Figura 2.5: Capacidade Emulsificante (CE) de caseína obtida de leite desnatado processado em HUAP	104
Figura 2.6: Estabilidade da Emulsão (EEm) de caseína obtida de leite desnatado processado em HUAP	105
Figura 2.7: Índice de Atividade Emulsificante (IAE) de caseína liofilizada obtida a partir de leite desnatado processado em HUAP.....	107
Figura 3.1: Sobrenadante e precipitado obtidos no processo de obtenção das proteínas do soro	126
Figura 3.2: Capacidade de Formação de Espuma (CFE) de proteínas do soro obtidas a partir de leite processado por HUAP.....	136

Figura 3.3: Variação do volume de espuma formada por proteínas de soro obtidas de leite desnatado processado por HUAP	138
Figura 3.4: Estabilidade da Espuma (EE) formada por proteínas de soro obtidas de leite desnatado processado em HUAP.....	139
Figura 3.5: Capacidade Emulsificante (CE) de proteínas de soro obtidas de leite desnatado processado em HUAP	140
Figura 3.6: Estabilidade da Emulsão (EEm) de proteínas de soro obtidas de leite desnatado processado em HUAP	141
Figura 3.7: Índice de Atividade Emulsificante (IAE) de proteínas do soro liofilizadas obtidas a partir de leite desnatado processado em HUAP	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção mundial de leite de vaca - 1995/2005	7
Tabela 2: Produção de Leite, Vacas Ordenhadas e Produtividade Animal no Brasil 2000/2005*	7
Tabela 1.1: Monitoramento das temperaturas durante o processamento de leite desnatado por HUAP	53
Tabela 1.2: Composição centesimal de leite desnatado processado em diferentes níveis de HUAP	55
Tabela 1.3: pH do leite desnatado processado em diferentes níveis de HUAP	56
Tabela 1.4: Nível de coagulação de leite desnatado após o processamento por HUAP	58
Tabela 1.5: Nível de coagulação de leite desnatado 24 horas após o processamento por HUAP	58
Tabela 1.6: Determinação de Nitrogênio Não Proteico (NNP) em leite processado em diferentes níveis de HUAP	64
Tabela 2.1: Composição centesimal em base seca de caseína liofilizada obtida à partir de leite desnatado processado em diferentes níveis de HUAP	97
Tabela 2.2: Solubilidade de caseína liofilizada obtida a partir de leite desnatado tratado em diferentes níveis de HUAP	99

Tabela 3.1: Composição centesimal em base seca de proteínas do soro liofilizadas obtidas a partir de leite desnatado processado em diferentes níveis de HUAP	133
--	-----

Tabela 3.2: Solubilidade de proteínas de soro liofilizadas obtidas a partir de leite desnatado tratado em diferentes níveis de HUAP.....	134
--	-----

RESUMO GERAL

O tratamento de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) é uma tecnologia que vem sendo utilizada tanto para inibir o crescimento de microorganismos, como para alterar as propriedades físico-químicas e funcionais do leite e de sua fração proteica. O objetivo deste estudo foi avaliar algumas das principais alterações físico-químicas de leite desnatado submetido a diferentes níveis de HUAP. Além disso, avaliar solubilidade, propriedades de aeração e emulsificação de caseína e proteínas de soro isoladas de leite processado por HUAP. Leite cru desnatado foi submetido a 3 níveis de pressão de homogeneização (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa) onde foram avaliadas as alterações físico-químicas do leite (pH, composição centesimal, estabilidade ao álcool, luminosidade, desnaturação de proteínas do soro, hidrofobicidade e viscosidade) e as propriedades funcionais da caseína e proteínas do soro (solubilidade, aeração e emulsificação). O processo apresentou boa repetibilidade e aumento de temperatura de no máximo 55°C. As medidas de pH e nitrogênio não proteico (NNP) foram as únicas variáveis que não apresentaram alteração estatisticamente significativa para nenhum dos níveis de pressão. Estabilidade a precipitação com álcool, luminosidade e hidrofobicidade apresentaram aumento a partir de 100 MPa. A desnaturação de proteínas do soro ocorreu somente a partir de 200 MPa, aumentando ainda mais com uso de 300 MPa. A única variável que apresentou alteração somente no nível de 300 MPa foi a viscosidade. A caseína e as proteínas do soro foram isoladas por acidificação a pH 4,6 e centrifugação, o sobrenadante e precipitado foram neutralizados e liofilizados. Foram avaliadas as seguintes propriedades: solubilidade, capacidade de formação de espuma, estabilidade de espuma, capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão. A caseína não sofreu alteração de solubilidade, já as propriedades de aeração e emulsificação apresentaram melhora de performance, sendo estatisticamente significativas a partir de diferentes níveis de pressão de acordo com a propriedade avaliada. As proteínas do soro apresentaram diminuição da solubilidade nos níveis de 100 MPa e 200 MPa, as propriedades de aeração foram melhoradas em 300 MPa, e as propriedades de emulsificação não foram influenciadas. O tratamento de leite fluido por tecnologia de HUAP promove alterações significativas em propriedades funcionais de caseína e proteínas do soro. As alterações estão relacionadas à desestruturação das micelas de caseína, desnaturação de proteínas do soro, interação das micelas entre si e com as proteínas do soro, e com o aumento da hidrofobicidade e capacidade de hidratação das mesmas.

GENERAL SUMMARY

The ultra high-pressure homogenisation (UHPH) is a recent technology used to inhibit microorganisms' growth, as to modify the physical-chemical properties of milk and its protein fraction. The purpose of this study was to evaluate the main physical-chemical characteristics caused by different levels of high-pressure homogenisation in skim milk. Besides to evaluate solubility, foaming properties and emulsifying properties of casein and whey proteins isolated from milk processed by UHPH. Raw skimmed milk was submitted to 3 pressure levels (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa), the processing parameters and the modifications on milk physical-chemical properties has been evaluated. The process presented good repeatability and the maximum temperature increase was 55°C. The measurements of pH and non-protein nitrogen (NPN) were the only variables that did not present any statistically significant change. Ethanol stability, lightness (L*) and hydrophobicity showed an improvement or increment from 100 MPa to 300 MPa. Whey protein denaturation occurred only from 200 MPa to 300 MPa. The only variable that presented changes only at 300 MPa was viscosity. Casein and whey proteins were isolated by acidification at pH 4.6 and centrifugation, further they were neutralized and freeze-dried. The following properties were evaluated: solubility, foaming capacity, foam stability, emulsifying capacity and emulsion stability. The freeze-dried casein did not show any modification on solubility, however all foaming and emulsifying characteristics presented improved performance, being statistically significant for different pressure levels according to each analysed property. UHPH decreased the solubility of the whey proteins obtained from milk treated at 100 MPa and 200 MPa, foaming properties increased for the freeze-dried protein obtained from milk treated at 300 MPa, and no influence were noted on the emulsifying properties. The treatment of fluid milk by UHPH was able to promote significant alterations on the functional properties of casein and whey proteins. The modifications were related to casein micelles disruption, whey proteins denaturation, interaction among the micelles and with denaturated whey proteins, and also with increase of molecular hydrophobicity and water retention.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Além de seu inquestionável valor nutricional e sua importância no crescimento dos mamíferos, o leite é hoje um dos principais alimentos mundialmente consumidos, sendo bem aceito por praticamente todas as raças e faixas etárias. O consumo de leite e de derivados lácteos cresce consistentemente em todo o mundo, inclusive no Brasil e, por isso, atualmente, o leite tem impacto na economia em nível mundial.

O leite de vaca é com certeza a variedade mais explorada mundialmente. Sua composição média segundo FOX & MCSWEENEY (1998) é de aproximadamente: 12,7% sólidos totais, 3,7% gordura, 3,4% proteína, 4,8% lactose e 0,7% cinzas. As proteínas são divididas em caseínas, que representam aproximadamente 80% do total, e as proteínas do soro, que correspondem a aproximadamente 20%.

Devido a suas propriedades peculiares, as proteínas podem ser consideradas o constituinte mais importante e versátil presente no leite, sendo fundamentais para a produção e característica de diversos derivados lácteos. Além disso, por causa de suas propriedades funcionais específicas, as proteínas do leite têm sido utilizadas como ingredientes em diversas outras classes de produtos, tais como maioneses, chocolates, sobremesas e bebidas.

Na maior parte das vezes o leite é preservado por tratamentos térmicos. O tratamento térmico permite a inibição dos microorganismos presentes no leite e, com isso, viabiliza a extensão de vida útil do produto e seu uso em processos industriais.

O uso de tratamentos alternativos ao tratamento térmico tem sido largamente avaliado. O uso da alta pressão em equipamentos do tipo isostático e de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) são opções viáveis para tratamento de leite e para a inibição de microorganismos. A HUAP é um processo contínuo, que bombeia o produto através de dois intensificadores de pressão, fazendo-o fluir através de uma válvula de homogeneização. O efeito da alta pressão ocorre em tempos bastante curtos e conta com efeitos simultâneos como cavitação, turbulência e aumento de temperatura. Ainda assim, este tratamento provavelmente compartilha alguns dos mecanismos de ação do tratamento de pressão isostático, embora a dinâmica do processo não coincida com aqueles descritos no processo isostático (GUERZONI et al., 1999).

A alta pressão causa uma série de alterações físico-químicas no leite e na estrutura e propriedades da fração proteica. É importante conhecer bem quais são estas alterações, como elas ocorrem e, principalmente, se influenciam positivamente ou

negativamente na preservação e viabilidade do uso do leite em vários produtos e processos. Além disso, estes efeitos específicos da alta pressão na fração proteica podem caracterizar uma oportunidade para alterar ou otimizar as propriedades funcionais das proteínas, gerando opções que tenham performance diferenciada daquelas existentes no mercado.

Este estudo tem como objetivos: (a) avaliar o efeito de diferentes níveis de tratamento de homogeneização a ultra-alta pressão (HUAP) sobre as características físico-químicas de leite desnatado; (b) isolar caseína e proteínas do soro obtidas de leite desnatado submetido a diferentes níveis de HUAP e avaliar sua performance em três das principais características funcionais das proteínas: solubilidade, aeração e emulsificação.

O presente trabalho encontra-se dividido em três capítulos. No capítulo 1 foi descrito e avaliado o efeito da alta pressão sobre algumas das principais características físico-químicas do leite, visando caracterizar as possíveis alterações causadas nos diferentes componentes do leite, mas com destaque nas alterações causadas na fração proteica. No capítulo 2 foram descritas a separação da caseína e sua avaliação em diferentes testes de funcionalidade. E no capítulo 3 foram descritas a separação das proteínas do soro e sua avaliação em diferentes testes de funcionalidade.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. O leite e sua composição

O leite é o produto secretado pelas glândulas mamárias de fêmeas de todas as espécies de mamíferos que tem como função primária suprir a complexa necessidade nutricional do neonato. Além disso, o leite aporta várias funções fisiológicas para o neonato (FOX & MCSWEENEY, 1998).

O leite vem sendo utilizado pela civilização para fins de alimentação e produção de derivados há mais de 10.000 anos, atualmente estes produtos estão entre os principais componentes da dieta humana em várias partes do mundo (HUPPERTZ et al., 2006).

As Tabelas 1 e 2 apresentam a produção de leite de vaca em nível mundial e no Brasil respectivamente. Fica evidente que o consumo de leite cresce consistentemente em praticamente todo o mundo.

Tabela 1: Produção mundial de leite de vaca - 1995/2005

Continente	Produção de Leite (mil t)			Variação (%) 2005/95	% total 2005
	1995	2000	2005		
Europa	222.288	209.643	210.575	- 5.3	39.7
América	128.221	142.749	151.741	18.3	28.6
Ásia	79.456	95.762	122.042	53.6	23.0
Oceania	17.822	23.486	24.843	39.4	4.7
África	16.646	19.594	21.517	29.3	4.0
TOTAL	464.433	491.234	530.718	14.3	100.0

Fonte: Brasil Embrapa – www.cnpqi.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela0211.php
Acesso: novembro/2006

Tabela 2: Produção de Leite, Vacas Ordenhadas e Produtividade Animal no Brasil 2000/2005*

Ano	Produção de Leite (milhões litros/ano)	Vacas Ordenhadas (mil cabeças)	Produtividade (litros/vaca/ano)
2000	19.767	17.885	1.105
2001	20.510	18.194	1.127
2002	21.643	18.793	1.152
2003	22.254	19.256	1,156
2004	23.475	20.023	1.172
2005 (*)	25.000	20.820	1.201

Fonte: Brasil Embrapa – www.cnpqi.embrapa.br/producao/dados2002/producao/2.30.htm
Acesso: novembro/2006

O leite é uma matéria prima muito atrativa, adaptável e flexível. Muitos dos processos aos quais o leite é submetido causam mudanças importantes em sua

composição, estado físico, estabilidade e atributos nutricionais e sensoriais (FOX & MCSWEENEY, 1998).

Do ponto de vista físico-químico, o leite é um fluido bastante complexo. Os constituintes do leite ocorrem em três fases. Quantitativamente, a maior parte da massa do leite é uma solução verdadeira de lactose, sais orgânicos e inorgânicos, vitaminas e outras moléculas pequenas em água. Nesta solução aquosa estão dispersas proteínas, algumas em nível molecular (proteínas do soro), outras como grandes agregados coloidais (caseínas), e lipídeos que coexistem em um estado emulsionado (FOX & MCSWEENEY, 1998).

O leite de vaca tem aproximadamente 3,5% de proteína sendo 2,9% caseína e 0,6% proteínas do soro. A caseína pode ser definida, de maneira simplificada, como a proteína precipitada por acidificação de leite a um pH 4,6, a 20°C. Quando a caseína é removida do leite desnatado, o líquido remanescente recebe nome de soro de leite, e as proteínas aí contidas, proteínas do soro. Cada uma destas frações apresenta características específicas em termos de composição, valor nutricional e propriedades funcionais (SGARBIERI, 1996).

As caseínas são um grupo de fosfoproteínas, são hidrofóbicas, têm uma carga relativamente alta e contêm vários resíduos de prolina e poucos de cisteína (HUPPERTZ et al., 2006). Segundo o modelo de WALSTRA (1990), as micelas são formadas por submicelas, aproximadamente esféricas, agregando várias moléculas de caseína com a seguinte relação: $\alpha_{s1}:\alpha_{s2}:(\beta+\gamma):\kappa = 4:1:4:1$ mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. As frações α_{s1} e α_{s2} representam entre 45 e 50% da quantidade total de proteína da micela, são formadas por uma estrutura de 199 resíduos de aminoácidos, são ricas em prolina e apresentam uma forte tendência de interação hidrofóbica. A fração $(\beta+\gamma)$ representa entre 28 e 42% da quantidade total de proteínas na micela, é formada por 209 resíduos de aminoácidos, apresenta uma fração (N-terminal) bastante hidrofílica porém o restante da molécula é fortemente hidrofóbico. A fração κ representa entre 8 e 15% da quantidade de proteína, é formada por 169 resíduos de aminoácidos, apresenta predominância de resíduos apolares na extremidade N-terminal (1-105) e resíduos polares na extremidade C-terminal (106-169) e ao contrário das demais frações proteicas não reagem com íons Ca^{+2} .

As proteínas do soro são bastante heterogêneas, as principais proteínas são a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina que representam 70-80% do total, mas também são encontradas a soroalbumina, imunoglobulinas, proteose-peptona, lactoferrina, transferrina

e enzimas (HUPPERTZ et al., 2006; SGARBIERI, 1996). A β -lactoglobulina é uma proteína globular e corresponde a 50% das proteínas do soro, e sua estrutura e propriedades de agregação dependem do pH (PITTIA et al., 1996). A α -lactoalbumina corresponde a 20% das proteínas do soro, trata-se uma proteína globular bastante compacta, e que se associa de várias formas dependendo das condições do meio (FOX & MCSWEENEY, 1998).

A produção de alimentos manufaturados criou uma demanda crescente para proteínas *food-grade* purificadas, geralmente chamadas de proteínas funcionais. O leite é fonte de pelo menos sete proteínas com funcionalidades significativamente diferentes: caseína ácida, caseína obtida por coalho (*rennet casein*), caseinatos, co-precipitados de caseínas e proteínas do soro, concentrados e isolados proteicos de soro e lactoalbumina (MULVIHILL & FOX, 1983).

2. Proteínas do leite e propriedades funcionais

O termo 'propriedade funcional de proteínas' com relação a alimentos refere-se àquelas propriedades físico-químicas de uma proteína que afetam a funcionalidade do alimento, i.e. sua textura (reologia), cor, aroma, absorção/ligação de água e estabilidade. Provavelmente as propriedades funcionais mais importantes são solubilidade, hidratação, reologia, atividade de superfície e geleificação (FOX & MCSWEENEY, 1998).

Para facilitar a compreensão, SGARBIERI (1996) descreve uma classificação para as propriedades funcionais segundo o comportamento físico-químico das proteínas:

1. Hidrofílicas: depende da afinidade da proteína pela água (solubilidade, capacidade de hidratação e de retenção de água).
2. Interfásicas: depende da capacidade das moléculas de proteína se unirem e formarem uma película entre duas fases imiscíveis (emulsificação e formação de espumas).
3. Intermoleculares: depende da habilidade da proteína de formar ligações cruzadas entre suas próprias moléculas ou com outros componentes do alimento (formação de fibras de proteínas, geleificação, formação de massa visco-elástica).
4. Reológicas: propriedades que dependem das características físico-químicas específicas das proteínas (viscosidade).

5. Organolépticas: são propriedades que se manifestam através dos órgãos dos sentidos sendo, por isso, também chamadas de propriedades sensoriais (textura, cor, gosto, aroma).

Em seu trabalho de 1997, MESSENS et al. definem alguns termos importantes relacionados às mudanças geradas na estrutura molecular das proteínas e que estão relacionadas às interações anteriormente descritas:

- Desnaturação proteica: qualquer alteração na conformação secundária, terciária ou quaternária que não é acompanhada de uma ruptura das ligações covalentes envolvidas na estrutura. A conformação final após desnaturação pode corresponder a uma estrutura polipeptídica totalmente ou parcialmente desnaturada.
- Associação: mudanças que ocorrem em nível molecular (por exemplo, dimerização), e são caracterizadas por ligações de interação fraca entre sítios específicos.
- Agregação ou polimerização, precipitação, coagulação e floculação: interações não específicas entre proteínas que resultam na formação de complexos grandes e de alto peso molecular.
- Geleificação: agregação ordenada de proteínas nativas ou desnaturadas, formando uma estrutura tridimensional na qual interações proteína-proteína e proteína-solvente são balanceadas para produzir uma matriz bem ordenada e capaz de reter grandes quantidades de água.

Deve-se assinalar que algumas propriedades funcionais dependem de mais de uma característica: a geleificação, a viscosidade e a solubilidade dependem da interação proteína-proteína, e da interação proteína-água. A emulsificação depende da solubilidade, hidrofobicidade, e do tamanho molecular (DAMODARAM, 1993).

2.1. Solubilidade

A propriedade de solubilidade de proteínas depende de sua composição em aminoácidos, conformação e tamanho molecular, e é fortemente influenciada por fatores como pH, força iônica e temperatura. A solubilidade de uma proteína depende da proporção entre os grupos hidrofóbicos (normalmente situados na parte interior da molécula) e de grupos hidrofílicos situados na superfície (SGARBIERI, 1998).

A solubilidade é dependente do estado físico-químico das moléculas de proteína, que pode ser afetado tanto favoravelmente como negativamente por tratamento térmico, secagem, e outros processos durante sua fabricação e estocagem (MORR et al., 1985).

A desnaturação da proteína é comumente avaliada pela menor solubilidade e por agregações que resultam em mudanças na conformação, ocasionado por um maior contato dos grupos hidrofóbicos da molécula com o solvente. (KARLESKIND et al., 1996). LUPANO et al. (1992) demonstraram que soluções de isolados proteicos de soro de leite submetidos a tratamento térmico, tiveram sua solubilidade aumentada em relação às soluções não aquecidas.

2.2. Aeração

Uma espuma é um sistema bifásico no qual uma bolha de ar é envolta por uma fase lamelar líquida contínua (PHILLIPS et al., 1990). A propriedade espumante de uma proteína envolve a formação de um filme de proteína contínuo e elástico na interface água/ar, para que este sistema bifásico e imiscível possa permanecer estável (SGARBIERI, 1998).

Em relação à formação de espuma, três atributos devem ser considerados: capacidade espumante, estabilidade da espuma e a consistência ou densidade da espuma (GIESE, 1994). Qualquer condição de processo que cause a desnaturação da proteína influencia a formação de espuma (MULVIHILL & FOX, 1983).

LIAO e MANGINO (1987) mostraram que as propriedades de formação de espuma de concentrados proteicos de soro correlacionam-se significativamente com o conteúdo de β -lactoglobulina e com a extensão da desnaturação da proteína. Os fatores mais importantes relacionados à capacidade de formação de espuma foram a hidrofobicidade e a concentração de grupos sulfidril.

Já estabilidade da espuma formada está relacionada a proteínas que exibem ótimas interações intermoleculares na interface da espuma e com isso formam uma rede contínua, coesiva e freqüentemente originam espumas muito estáveis (DAMODARAM, 1996).

2.3. Emulsificação

Uma emulsão pode ser definida como uma mistura de dois líquidos imiscíveis, um dos quais é disperso na forma de glóbulos no outro líquido. O que torna a emulsão estável é a presença de um agente emulsificante, que diminui a tensão superficial existente e permite a formação de emulsão com mais baixo nível de energia (SGARBIERI, 1996).

Da mesma forma que para espumas, também para as emulsões é importante avaliar dois atributos: capacidade de formar emulsão e a capacidade de manter a emulsão estável. Segundo WAGNER (2000), estas características são influenciadas por diversos fatores: concentração, solubilidade e tipo de proteína; pH, força iônica, tipos de íons, presença de hidrocolóides e açúcares (fase dispersante); tipo de óleo, presença de fosfolipídeos, ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos, presença de outros surfactantes lipossolúveis (fase dispersa); e a incorporação de ar e viscosidade (em ambas as fases).

Na formação da emulsão, as moléculas de proteína se difundem e são adsorvidas na interface óleo/água. A migração da proteína da solução para a interface é termodinamicamente favorável porque uma certa energia conformacional e de hidratação da proteína é perdida na interface. Atingida a interface, a maioria das proteínas sofre um desdobramento, uma reorientação e se espalha para formar um filme contínuo e coesivo (PHILLIPS, 1981).

Melhoras nas propriedades emulsificantes podem ser conseguidas por procedimentos que modificam a estrutura da proteína (PITTIA et al., 1996). A formação de uma emulsão depende da adsorção da proteína, que é influenciada pela hidrofobicidade superficial e que determina a afinidade da proteína com a interface óleo-água; e da flexibilidade da proteína, que determina a sua habilidade de desnaturar na interface óleo-água (MCCRAE et al., 1999).

3. O processamento de ultra alta pressão

Uma das limitações do leite como matéria-prima é sua perecibilidade. O leite é uma excelente fonte de nutrientes para os microorganismos, bem como para os seres humanos. Todavia esta perecibilidade pode ser prontamente superada por uma série de processos (FOX & MCSWEENEY, 1998). Processar alimentos por alta pressão oferece uma vantagem única sobre o tratamento térmico tradicional, pois ele exerce efeito

antimicrobiano sem alterar a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (HUPPERTZ et al., 2002).

O tratamento de alta pressão é uma tecnologia emergente que está sendo desenvolvida e aplicada como processo mínimo para a produção de uma larga variedade de alimentos seguros e nutritivos. Em termos de ciência dos alimentos, as principais áreas de interesse, são: o desenvolvimento de processos de preservação por meio da destruição de microorganismos; o desenvolvimento de novas ou aprimoradas propriedades funcionais de biopolímeros por meio de mudanças na sua estrutura; além da melhoria do controle de reações enzimáticas, tanto pela promoção quanto pela inibição das mesmas, por meio de alteração de sua cinética (JOHNSTON et al., 1992).

Segundo CAMPOS et al. (2002), o método de tratamento isostático, também chamada de Ultra Alta Pressão (UAP), consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de um vaso pressurizado, utilizando um meio que transfere a pressão ao produto (para alimentos tem-se utilizado água potável como meio). Uma característica única deste tipo de tratamento é que a pressão é transmitida uniforme e rapidamente através de todo o alimento (i.e. isostático), então todo o alimento, sem restrição de tamanho ou formato é tratado na mesma intensidade (GALAZKA & LEDWARD, 1995).

Sob alta pressão qualquer reação ou alteração que resulta numa redução de volume vai ser favorecida. Muitas proteínas são desnaturadas pela alta pressão, pois a sua desnaturação caracteristicamente resulta em uma redução do volume molar. A desnaturação ocorre principalmente como resultado do rompimento de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (pontes de hidrogênio e ligações covalentes geralmente não são afetadas por alta pressão) (NEEDS et al., 2000).

HUPPERTZ et al. (2002) relatam que a estrutura primária de proteínas não é alterada em nenhum nível de pressão, a alteração da estrutura secundária e de pontes de hidrogênio pode ocorrer em pressões muito altas e em geral são irreversíveis, a estrutura terciária com suas ligações do tipo hidrofóbicas e iônicas em geral é modificada em níveis de pressão da ordem de 200 MPa, e finalmente a estrutura quaternária pode ser alterada em pressões tão baixas quanto 150 MPa.

Apesar dos primeiros relatos de homogeneização datarem do início do século vinte, somente recentemente a homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) tem se desenvolvido. Este processo e novos equipamentos baseiam-se no mesmo princípio dos homogeneizadores tradicionais, mas operam em níveis de pressão muito mais altos (HAYES & KELLY, 2003). Segundo CAMPOS et al. (2002), o tratamento de

Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) trata-se de um processo contínuo, que bombeia o produto através de dois intensificadores de pressão, fazendo-o fluir através de uma válvula de homogeneização.

A HUAP de até 1500 bar tem sido proposta como uma alternativa efetiva à pasteurização de leite (GUERZONI et al., 1999). Possíveis aplicações de HUAP incluem redução do peso molecular de hidrocolóides em solução, inativação de bacteriófagos, destruição de bactérias, mudança das propriedades funcionais de leite desnatado, desnaturação de enzimas e efeitos nas características microbiológicas e de textura de queijos (HAYES et al., 2005). Este tratamento provavelmente compartilha alguns dos mecanismos de ação do tratamento de pressão isostático, embora a dinâmica do processo não coincida com aqueles descritos no processo isostático (GUERZONI et al., 1999).

A descompressão rápida do líquido causa a formação de bolhas (ou cavidades) que crescem no corpo do líquido. O colapso de tais cavidades pode transmitir várias forças localizadas para a superfície ou partículas, inclusive de células microbianas (LANCIOTTI et al., 1996). Além disso, BOUAQUINA et al. (2006) ressaltam que em operações de alta pressão dinâmica a exposição à alta pressão ocorre em tempos muito curtos (aproximadamente 10^{-4} segundos) e que os fenômenos de cavitação, turbulência e aumento de temperatura ocorrem simultaneamente. Segundo HAYES et al. (2005), DATTA et al. (2005), SANDRA & DALGLEISH (2005) e HAYES & KELLY (2003) este aumento de temperatura apresenta correlação linear com o aumento de pressão.

Foi demonstrado que o tratamento de HUAP modifica a estrutura e/ou características de proteínas (HUMBERT et al., 1980; SANDRA & DALGLEISH, 2005). SUBIRADE et al. (1998) sugerem que a arquitetura da β -lactoglobulina é estabilizada por interações suavemente diferentes antes e depois de exposta a HUAP.

4. Efeitos do tratamento de ultra alta pressão em leite

Tratamento de pressão pode trazer alterações substanciais ao sistema do leite. Por exemplo, tratamento de alta pressão causa mudanças na cristalização de gordura, desnaturação de proteínas do soro em leite e soro, aumenta a exposição de grupos hidrofóbicos das proteínas do leite e altera seu equilíbrio mineral (ANEMA et al., 2005). As principais alterações físico-químicas e o efeito nos principais constituintes do leite são apresentados a seguir:

4.1. pH

HUPPERTZ et al. (2002) sugerem que efeitos da alta pressão isostáticos sobre o equilíbrio mineral do leite podem alterar seu pH, e que esta variação está relacionada com a solubilização do fosfato de cálcio coloidal. KIELCZEWSKA et al. (2004) e ZOBRIST et al. (2005) relatam aumento do pH de leite integral da ordem de 0,04 e 0,08 respectivamente. Por outro lado LOPEZ-FANDINO et al. (1996 e 1998b) e HARTE et al. (2003) usando leite integral, e JOHNSTON et al. (1992) usando leite desnatado, não encontraram nenhuma alteração de pH antes e após o tratamento. Segundo HUPPERTZ et al. (2002) esta diferença de resultados pode estar relacionada às condições de medida, uma vez que a variação de pH é reversível.

Em tratamentos de HUAP, HAYES & KELLY (2003) reportaram diminuição do pH de leite tratado a 200 MPa e associaram esta diminuição à atividade da enzima lipoproteína-lipase (LPL), que encontra maior quantidade de glóbulos de gordura susceptíveis ao ataque devido ao efeito da homogeneização nos glóbulos de gordura. Já HAYES et al. (2005) notaram diminuição de pH em leite tratado até 150 MPa mas nenhuma variação em leite tratado a 200 MPa e 250 MPa. SANDRA & DALGLEISH (2005) e KIELCZEWSKA et al. (2003) não notaram alteração no pH de leite submetido a HUAP de até 200 MPa. Enquanto HUMBERT et al. (1980) encontraram diminuição de pH para os níveis de 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa.

4.2. Estabilidade a precipitação por álcool

O leite é desestabilizado pela adição de etanol acima de um nível crítico dependente das condições físico-químicas em que se encontram as micelas. A estabilidade a precipitação por álcool tem sido utilizada como um teste para determinar a adequação do leite para processos de esterilização e/ou concentração. A precipitação das proteínas do leite por álcool ocorre devido à redução da constante dielétrica do meio, diminuindo as forças eletrostáticas repulsivas responsáveis pela estabilidade do sistema micelar (HEWEDI et al., 1985; JOHNSTON et al., 2002). O balanço salino do leite influencia a estabilidade a precipitação por álcool, uma vez que o aumento da concentração de cálcio solúvel favorece a desestabilização das micelas (HUPPERTZ et al., 2004).

Tratamentos de alta pressão isostática diminuem a estabilidade de leite ao etanol, principalmente abaixo de seu pH natural (JOHNSTON et al., 2002). Segundo HUPPERTZ et al. (2004), este efeito ocorre devido à solubilização do cálcio e também devido à dissociação da κ -caseína, fatores que diminuem a estabilidade das micelas e facilitam a coagulação mediada pelo álcool. HUPPERTZ et al. (2004) relatam ainda que esta instabilidade é parcialmente reversível a 5°C, provavelmente devido a reassociação do cálcio e reestruturação das micelas, ainda que estes efeitos resultem em uma estrutura diferente da original. Nenhum dado foi encontrado quanto ao efeito de HUAP e estabilidade a precipitação por álcool.

4.3. Luminosidade

As propriedades óticas de leite desnatado são afetadas consideravelmente pela alteração do número e tamanho das micelas de caseína (HUPPERTZ et al., 2006). A análise de luminosidade de leites submetidos a tratamento de alta pressão isostática demonstrou pouca ou nenhuma variação para pressões de 100-200 MPa, diminuição progressiva do valor para pressões entre 200-400 MPa, e pouca diminuição posterior em pressões acima de 400 MPa (HUPPERTZ et al., 2004b; HARTE et al., 2003; NEEDS et al., 2000 e 2000b; GAUCHERON et al., 1997; DESOBRY-BANON et al., 1994; JOHNSTON et al., 1992). Os autores associam que a redução do valor de luminosidade seja causada pela ruptura das micelas de caseína. Esta alteração é irreversível para estocagem refrigerada e quase totalmente reversível em estocagem maior que 10°C (HUPPERTZ et al., 2004). Segundo ORLIEN et al. (2006) a associação após o tratamento está relacionada sobretudo com interações hidrofóbicas.

Os dados encontrados para tratamento HUAP são bastante variados, mas todos eles associam as mudanças com a variação do diâmetro das micelas de caseína. HAYES & KELLY (2003) e KIELCZEWSKA et al. (2003) relatam aumento do valor de luminosidade em pressões a partir de 50 MPa, sendo que a luminosidade obtida para os níveis de 100 MPa a 200 MPa não apresentou variação estatisticamente significativa. HAYES et al. (2005) relataram não haver variação estatisticamente significativa de luminosidade de leites tratados entre 150 MPa e 250 MPa. Já SANDRA & DALGLEISH (2005) relatam diminuição da luminosidade de leite desnatado reconstituído em pressões de 180 MPa.

4.4. Hidrofobicidade

As mudanças na estrutura conformacional das proteínas, indicada pelo aumento da exposição de grupos hidrofóbicos, faz com que se espere alterações nas propriedades funcionais do sistema (PITTIA et al., 1996). GAUCHERON et al. (1997) relataram que o tratamento de alta pressão isostática causa maior exposição dos grupos hidrofóbicos da caseína, como anteriormente sugerido por JOHNSTON et al. (1992). No mesmo estudo, GAUCHERON et al. (1997) apresentam como consequência deste efeito, uma maior hidratação das moléculas de proteína, mais uma vez em acordo com os resultados de JOHNSTON et al. (1992) e MASSON (1992). PITTIA et al. (1996) submeteram uma solução de β -lactoglobulina a tratamento de alta pressão isostática e também constataram aumento da hidrofobicidade do sistema, indicando uma desnaturação parcial e a formação de agregados proteicos que conseqüentemente diminuíram as propriedades funcionais de emulsificação e aeração desta proteína.

A hidrofobicidade é outro valor ainda pouco estudado em processo de HUAP. BOUAOUINA et al. (2006) avaliaram o efeito de pressões variando entre 50 MPa e 300 MPa sobre a hidrofobicidade de uma solução de isolado proteico de soro. Os resultados demonstram aumento gradual da hidrofobicidade com o aumento da pressão aplicada. Os autores associam este aumento ao rompimento de complexos proteicos, aumentando assim a exposição de sítios hidrofóbicos.

Em nível molecular, aplicação de HUAP deve induzir o aumento na exposição de sítios hidrofóbicos, como acontece com tratamento isostático, devido a mudanças de volume associado com sua formação. Nas micelas de caseína, a ampla estrutura supramolecular é provavelmente rompida sob alta pressão e permite que os componentes movam-se mais livremente e tornem-se mais independentes da estrutura original (GUERZONI et al., 1999).

4.5. Viscosidade

A viscosidade de leite tem estreita relação com as características das micelas de caseína, pois a viscosidade de um sistema coloidal como o leite depende basicamente do volume ocupado pelas moléculas em suspensão (HARTE et al. 2003).

Com relação à viscosidade existe consenso dentro da literatura científica. O tratamento de alta pressão isostática aumenta a viscosidade do leite, conforme

demonstrado por diversos autores (SHIBAUCHI et al., 1992; DESOBRY-BANON et al., 1994; MUSSA & RAMASWAMY, 1997 e HARTE et al., 2003). Quanto maior a pressão e mais prolongado o tempo de tratamento, maior a viscosidade final do produto (MUSSA & RAMASWAMY, 1997). Segundo HARTE et al. (2003) o aumento de viscosidade está associado à redução do tamanho das micelas, aumento de volume devido ao aumento da sua capacidade de hidratação, desnaturação de proteínas do soro e interação das mesmas com as micelas de caseína e aumento da concentração de fosfato de cálcio na fase solúvel (soro) do leite.

Da mesma forma, HUMBERT et al. (1980) sugerem que tratamento de HUAP causa aumento de viscosidade em leite. Utilizando leite integral, KIELCZEWSKA et al. (2003) relatam aumento da viscosidade com o aumento da pressão, e associam o aumento com a maior dispersão da gordura e a subsequente adsorção de proteínas na interface dos glóbulos dispersos.

5. Efeitos do tratamento de alta pressão nos constituintes do leite

Com relação aos diferentes constituintes do leite, os tratamentos de alta pressão causam alteração em praticamente todos eles. Os principais são apresentados a seguir:

5.1. Gordura

A homogeneização é usada na indústria de alimentos para reduzir separação de gordura em leite e creme de leite, e para criar ou aumentar a estabilidade de emulsões alimentares; a estabilidade é conseguida pela redução de tamanho e por mudanças estruturais nos glóbulos de gordura, o que ao mesmo tempo aumenta sua área superficial permitindo que substâncias ativas como as proteínas do leite possam ser adsorvidas (SANDRA & DALGLEISH, 2005).

Relativamente poucos estudos examinaram o efeito do tratamento isostático de ultra alta pressão na gordura do leite. HUPPERTZ et al. (2002) relataram que pressões inferiores a 400 MPa não afetaram nem o diâmetro médio e nem a distribuição de tamanhos dos glóbulos de gordura, entretanto pressões superiores a 400 MPa causam aumento no diâmetro dos glóbulos e distribuem mais amplamente as variações de tamanho entre os glóbulos. TRUJILLO et al. (2002) também avaliaram leite submetido a tratamento isostático de ultra alta pressão variando de 100 MPa a 500 MPa e não

notaram aumento nos produtos de lipólise durante a estocagem, sugerindo que não ocorreu nenhum dano às membranas dos glóbulos de gordura.

Vários autores relataram efeito antagônico ao efeito do tratamento isostático quando utilizado o tratamento de HUAP (SANDRA & DALGLEISH, 2005; HAYES et al., 2005; DATTA et al., 2005; HAYES & KELLY, 2003; KIELCZEWSKA et al., 2003, KHEADR et al., 2002) que causou diminuição significativa do diâmetro dos glóbulos de gordura.

Segundo HAYES et al. (2005) e KIELCZEWSKA et al. (2003) os glóbulos de gordura obtidos em HUAP são menores que aqueles obtidos em tratamentos convencionais de homogeneização e que em leite cru. Para recobrir esta maior área superficial dos glóbulos de gordura, parte da caseína do leite é adsorvida na interface dos novos glóbulos formados, sendo preferencialmente adsorvidas as micelas desnaturadas/fragmentadas em detrimento das micelas intactas (HAYES et al., 2003). Além disso, foi notada uma diminuição na proporção κ -caseína ao redor dos glóbulos de gordura, o que indica que a adsorção é feita principalmente por micelas de caseína de tamanho grande (KIELCZEWSKA et al., 2003).

5.2. Lactose

A lactose no leite e em produtos lácteos pode ser isomerizada em lactulose pelo efeito do aquecimento e formar ácidos e outros açúcares. Nenhuma alteração nestes compostos foi observada após pressurização (100–400 MPa por 10-60 minutos a 25°C), sugerindo que nenhuma reação de Maillard ou isomerização da lactose ocorre em leite após tratamento de alta pressão isostática (LOPEZ-FANDINO et al., 1996). Nenhum dado foi encontrado quanto ao efeito de HUAP sobre a lactose.

5.3. Sais

Segundo TRUJILLO et al. (2002) e DESOBRY-BANON et al. (1994) a desintegração das micelas causa mudança no balanço salino do leite, sendo notado aumento da concentração de fosfato de cálcio na fase solúvel. Entretanto outros autores não encontraram nenhuma (JOHNSTON et al., 1992; DE LA FUENTE et al., 1999) ou muito pouca (LOPEZ-FANDINO et al., 1998b) variação na quantidade de cálcio iônico após tratamentos de alta pressão isostática de até 600 MPa. LOPEZ-FANDINO et al. (1998b) relataram que além do cálcio ocorreu também um aumento de Fósforo e

Magnésio na forma iônica em tratamentos de 100 MPa. Tem sido proposto que a dissociação micelar induzida por alta pressão isostática não resulta exclusivamente da quebra de ligações entre caseínas e sais inorgânicos, mas que a alta pressão isostática exerce também um efeito de rompimento de ligações hidrofóbicas importante para a manutenção da integridade das micelas (LOPEZ-FANDINO, 2006). Nenhum dado foi encontrado quanto ao efeito de HUAP sobre o balanço salino de leite.

5.4. Enzimas

Já se relatou a existência de ao menos 60 enzimas endógenas no leite bovino, sendo que grande parte delas ainda não tem seu papel fisiológico completamente elucidado (FOX & MCSWEENEY, 1998). Os estudos de alta pressão são concentrados em apenas algumas delas e de forma geral todas apresentam uma alta estabilidade. Segundo SCOLLARD et al. (2000) tratamento de leite cru a 600 MPa a 20°C causa redução de 75% na atividade da plasmina, e este efeito ocorre substancialmente mais rápido com o aumento da temperatura. Já a fosfatase alcalina perde apenas 50% de sua atividade quando submetida tratamento de 600 MPa a 20°C por 60 minutos (LOPEZ-FANDINO et al., 1996). LUDIKHUYZE et al. (2001) relataram que a alta pressão isostática aumentou a estabilidade da lactoperoxidase e sugeriram que certas condições específicas poderiam então aumentar o potencial antimicrobiano do leite.

HAYES et al. (2005) e DATTA et al. (2005) demonstraram diminuição na atividade de plasmina, fosfatase alcalina e lactoperoxidase de leite tratado em HUAP a 200 MPa com relação ao leite cru, mas não com leite tratado pasteurizado. DATTA et al. (2005) demonstraram aumento na atividade de lipoproteína-lipase (LPL).

6. Proteínas do leite tratado por ultra alta pressão

As maiores e talvez mais importantes alterações em leite tratado por HUAP estão relacionadas com as proteínas, tanto caseína quanto proteínas do soro.

É de suma importância na produção de produtos lácteos a modificação das propriedades estruturais e funcionais da proteína submetida a um tratamento de alta pressão isostática (NEEDS et al., 2000).

O potencial do uso de alta pressão, como uma alternativa de modificação física de constituintes macromoleculares de alimentos, como as proteínas, já foi reconhecido.

Vários estudos básicos demonstraram que existem alterações na estrutura e função das proteínas submetidas a tratamento de pressão isostática de até 1000 MPa (BALNY et al., 1989).

Sob alta pressão qualquer reação ou modificação que resulta em uma diminuição de volume é favorecida. Muitas proteínas são desnaturadas pela alta pressão, uma vez que o desdobramento ou desnaturação geralmente resulta em uma redução do volume molar. A desnaturação ocorre principalmente como resultado da quebra de ligações hidrofóbicas e interações eletrostáticas, já pontes de hidrogênio e ligações covalentes geralmente não são afetadas por alta pressão (NEEDS et al., 2000).

Segundo MESSENS et al. (1997), a aplicação de alta pressão isostática em soluções proteicas causa tanto alterações reversíveis quanto irreversíveis na estrutura conformacional da proteína, causando a quebra de ligações iônicas, pontes de hidrogênio e de interações hidrofóbicas. Alta pressão isostática (até 1000 MPa) pode afetar a conformação da proteína e levá-la a desnaturação, agregação ou geleificação, dependendo do sistema proteico, da pressão aplicada, da temperatura e da duração do tratamento de pressão. (MESSENS et al., 1997)

No seu estado nativo, as proteínas são estabilizadas por ligações covalentes (incluindo pontes S-S), interações eletrostáticas (pares iônicos, grupos polares), pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Ligações covalentes praticamente não são afetadas por alta pressão e, portanto, a estrutura primária de proteínas segue intacta durante tratamento de alta pressão (MOZHAEV et al., 1996).

Mudanças na estrutura secundária ocorrem em altas pressões e levam à desnaturação irreversível, uma vez que as pontes de hidrogênio que a estabilizam são reforçadas em baixas pressões e rompidas apenas em níveis muito altos de pressão (HUPPERTZ et al., 2002 e 2004b).

Alterações significativas na estrutura terciária de proteínas, as quais são mantidas principalmente por ligações hidrofóbicas e interações iônicas, são observadas em pressões maiores que 200 MPa. Ligações iônicas em soluções aquosas são fortemente desestabilizadas pela pressão, devido ao efeito eletro-restritivo de cargas separadas: na vizinhança de cada íon, moléculas de água são organizadas mais densamente que na água pura, causando desse modo uma redução de volume (HENDRICKX et al., 1998). Da mesma forma, interações hidrofóbicas entre grupos alifáticos são caracterizadas por aumentos de volume, sendo assim, são desestabilizadas por altas pressões (MOZHAEV et al., 1996).

Proteínas oligoméricas, mantidas principalmente por reações não covalentes, dissociam-se em pressões relativamente baixas, rompendo desse modo a estrutura quaternária (HENDRICKX et al., 1998). A dissociação delas em suas subunidades pode ser obtida utilizando pressões moderadas, ao redor de 150 MPa (CHEFTEL, 1991).

O processamento de leite por alta pressão induz modificações nas principais proteínas do leite: caseínas e proteínas do soro (TRUJILLO et al., 2002). As mudanças em ambas são descritas nos tópicos a seguir.

6.1. Caseína

A aplicação de alta pressão isostática em leite desnatado reconstituído causa desestabilização das micelas. A 20°C as mudanças iniciam-se a \cong 150 MPa e atingem um platô a \cong 400 MPa (SHIBAUCHI et al., 1992).

NEEDS et al. (2000) reportaram que as micelas de caseína foram desintegradas pela pressão isostática e que esta desintegração foi completa em tratamentos iguais ou superiores a 400 MPa. A desintegração das micelas resulta em diminuição de seu diâmetro sendo a diminuição dependente do nível de pressão aplicada.

DESOBRY-BANON et al. (1994), GAUCHERON et al. (1997) e HUPPERTZ et al. (2004b) relataram não haver diferença no diâmetro das micelas de caseína em leite tratado em pressão isostática de 150 MPa e 200 MPa. NEEDS et al. (2000) e ANEMA et al. (2005) encontraram uma ligeira diminuição em leite desnatado tratado em alta pressão isostática entre 100-200 MPa.

GAUCHERON et al. (1997) e DESOBY-BANON et al. (1994) encontraram diminuição na ordem de 40 a 50% no diâmetro das micelas de leite tratado em pressão isostática entre 400 MPa e 600 MPa. NEEDS et al. (2000) encontraram valores médios de 150-200 nm para o leite desnatado não tratado e valores menores de 110 e 106 nm para tratamentos de 400 e 600 MPa, respectivamente.

Medidas de distribuição de tamanho de partículas revelaram que tratamentos de alta pressão isostática de 100-150 MPa a 20°C induziram um aumento do volume hidrodinâmico da população principal de caseína e uma dissociação limitada das micelas maiores. Tratamento de alta pressão isostática a 200 MPa leva a dissociação micelar, enquanto que em 250 MPa o fenômeno de agregação supera a dissociação anterior. Em pressões mais altas, tamanhos menores foram predominantes (REGNAULT et al., 2004).

É provável que a dissociação de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (MOZHAEV et al., 1996; LOPEZ-FANDINO, 2006) associado à diminuição de fosfato de cálcio coloidal (SCHRADER et al., 1997) sejam responsáveis pela desintegração das micelas.

Vários autores relataram também um fenômeno de reassociação de parte das micelas após tratamento e estocagem prolongados (NEEDS et al., 2000; HUPPERTZ et al., 2004; REGNAULT et al., 2004 e HUPPERTZ et al., 2006). Segundo ORLIEN et al. (2006), leite desnatado tratado em pressão isostática entre 200 a 300 MPa originou uma dissociação das micelas em micelas menores, porém mais susceptíveis a reassociação em micelas maiores que no leite sem tratamento. Segundo os autores este fenômeno ocorre por meio de reações hidrofóbicas entre as micelas dissociadas.

A Figura 1 foi adaptada a partir de ORLIEN et al. (2006) e ilustra a possível dinâmica de associação e dissociação das micelas em diferentes momentos e níveis de pressão.

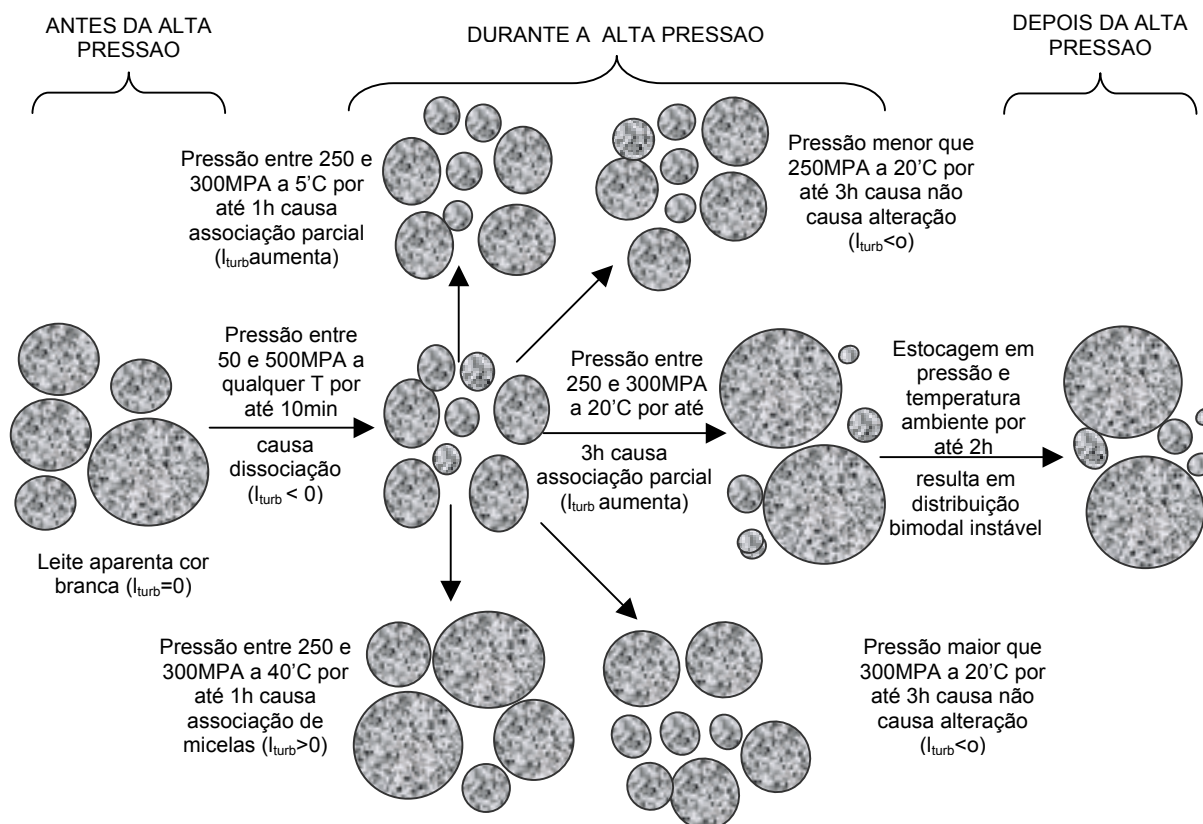


Figura 1: Alterações nas micelas de caseína durante e após processamento de alta pressão isostática

Fonte: Orlien et al. (2006) – Fig. 6. Changes in casein micelles during and after high pressure (P) treatment of skim milk at various temperatures (T). The sizes of the casein micelles in the figure are based on the results of turbidity index (I_{turb}) and from dynamic light scattering.

Vários autores relatam a diminuição do diâmetro das micelas de caseína em leite tratado por HUAP e que este aumento é em geral maior quanto maior for a pressão aplicada (SANDRA & DALGLEISH, 2005; HAYES & KELLY, 2003 e KHEADR et al., 2002). O diâmetro da micela de caseína de leite pasteurizado foi de 200-300 nm, enquanto que as micelas de caseína de leite submetido a HUAP a 200 MPa foi de 125-150 nm (KHEADR et al., 2002). Já HAYES & KELLY (2003) não notaram nenhuma alteração até 150 MPa e uma redução de diâmetro de apenas 5% em tratamento de 200 MPa.

A análise microscópica de leite tratado por HUAP sugere a interação de micelas desnaturadas de caseína entre si e com os glóbulos de gordura (KHEADR et al., 2005). A HUAP modifica o estado micelar causando a formação de agregados de micelas com formato variável e formação de complexos entre as proteínas e os glóbulos de gordura.

Segundo KHEADR et al. (2002), as frações desintegradas de caseína associam-se para recobrir a maior área superficial dos glóbulos de gordura gerados pela homogeneização. Entretanto, detalhes sobre este fenômeno e a existência ou não de reassociação, ainda não foram estudados. SANDRA & DALGLEISH (2005) sugeriram que o rompimento das ligações hidrofóbicas e interações iônicas, juntamente com os efeitos de cavitação e turbulência seriam os responsáveis pela desintegração das micelas de caseína.

Outra alteração importante no sistema micelar é a migração de micelas da fração coloidal para a fração solúvel de micelas. O tratamento de alta pressão isostática (100-400 MPa) aumenta significativamente a transferência de caseínas individuais da fase coloidal para a fase solúvel do leite. A dissociação das frações de caseína ocorrem na seguinte ordem: $\beta > \kappa > \alpha s1 > \alpha s2$ (LOPEZ-FANDINO et al., 1998b). A ordem de dissociação das caseínas corresponde amplamente ao conteúdo de grupos serina-fosfato em cada fração, indicando que as caseínas com maior quantidade de ligações com o fosfato de cálcio coloidal dissociam-se em menor extensão (HUPPERTZ et al., 2002).

HUAP faz com que parte da κ e αs caseína micelar tornem-se mais solúveis, possivelmente devido a quebra de ligações hidrofóbicas nas proteínas próximas da superfície das micelas (SANDRA & DALGLEISH, 2005).

6.2. Proteínas do soro

Outro efeito importante notado foi que, além da caseína, também possivelmente as proteínas do soro foram alteradas, tornando-se precipitáveis ou associando-se à caseína, uma vez que ocorreu diminuição do valor de nitrogênio não caseíco (NNC) de leite submetido a tratamento de alta pressão isostático (JOHNSTON et al., 1992; GAUCHERON et al., 1997; FELIPE et al., 1997; KIELCZEWSKA et al., 2004).

Tratamento de leite cru em pressões isostáticas de até 100 MPa não desnatura a β -lactoglobulina (LOPEZ-FANDINO et al., 1996; LOPEZ-FANDINO & OLANO, 1998; SCOLLARD et al., 2000). Aplicações de pressões mais altas desnaturam progressivamente a β -lactoglobulina com o aumento da pressão aplicada, alcançando até 70-80% em 400 MPa (LOPEZ-FANDINO et al., 1996; SCOLLARD et al., 2000; NEEDS et al., 2000; NEEDS et al., 2000b). Acima de 400 MPa nota-se pouco incremento de desnaturação (SCOLLARD et al., 2000).

Segundo FELIPE et al. (1997) e NEEDS et al. (2000), em tratamentos de leite em alta pressão isostática a β -lactoglobulina inicialmente tende a se auto-agregar e somente posteriormente formar agregados insolúveis com a κ -caseína. Também este processo mostrou-se parcialmente reversível em função da estocagem a 4°C após a descompressão. (MESSENS et al., 1997)

Estudos quantitativos demonstraram que a maior parte da β -lactoglobulina desnaturada em leite desnatado submetido a tratamento isostático de alta pressão associa-se com as micelas de caseína; uma pequena parte continua não sedimentável, quer seja na forma de agregados de proteína do soro ou associados com partículas de caseína muito pequenas para serem sedimentadas (HUPPERTZ et al., 2006; NEEDS et al., 2000b; SCOLLARD et al., 2000).

Para entender melhor as mudanças na estrutura da β -lactoglobulina vários autores estudam o comportamento de uma solução submetida a tratamento de alta pressão isostática (DUFOUR et al., 1994; DUMAY et al., 1994; FUTENBERGER et al., 1995; FELIPE et al., 1997). Estes mesmos autores indicaram que uma solução pura de β -lactoglobulina submetida à alta pressão isostática gerou uma alteração conformacional durante e após o tratamento levando a uma desnaturação irreversível e agregação com a formação de pontes S-S. PITTIA et al. (1996) destacaram que o tratamento de uma solução de β -lactoglobulina apresentou aumento da exposição dos sítios hidrofóbicos, bem como o aumento no potencial de se auto-agregar. Porém, nestes níveis de

tratamento não houve alteração da estrutura secundária da β -lactoglobulina. Já em níveis superiores de tratamento (1000 MPa / 10 minutos), HAYASHI et al. (1992) reportaram alteração da estrutura secundária.

A α -lactoalbumina, outra fração importante das proteínas soro, é mais resistente à pressão isostática que a β -lactoglobulina (HAYASHI, 1987; LOPEZ-FANDINO et al., 1996; GAUCHERON et al., 1997; NEEDS et al., 2000; NEEDS et al., 2000b).

GAUCHERON et al. (1997) notaram através de análises por GP-HPLC que a quantidade de α -lactoalbumina em sobrenadante de leite centrifugado praticamente não variou com diferentes pressões aplicadas, tendo valores percentuais maiores que 95% do valor total do leite sem tratamento. Já LAW et al. (1998) reportaram que a desnaturação de α -lactoalbumina só foi detectada em tratamentos isostáticos de 500 MPa a 20°C e 400 MPa a 45°C.

Segundo FELIPE et al. (1997), que também encontraram resultados de pouca desnaturação da α -lactoalbumina mesmo em pressões de 500 MPa, esta resistência à agregação pode estar relacionada à ausência de grupos SH livres e a dificuldade inicial em formar ligações covalentes com outras proteínas. A maior baroestabilidade da α -lactoalbumina tem sido relacionada a sua estrutura molecular mais rígida, devido a presença de um maior número de pontes dissulfeto intra-moleculares (4 pontes) e com a ausência do grupo sulfidril livre (LOPEZ-FANDINO et al., 1996; LOPEZ-FANDINO & OLANO, 1998; HUPPERTZ et al., 2004c).

HUPPERTZ et al. (2004c) sugeriram o seguinte mecanismo de desnaturação para β -lactoglobulina e α -lactoalbumina em leite submetido a tratamento de alta pressão isostática: sob pressão, a β -lactoglobulina desnatura resultando na exposição do grupo sulfidril livre da β -lactoglobulina; este grupo sulfidril livre pode interagir com a κ -caseína, α -lactoalbumina ou β -lactoglobulina, e possivelmente α 2-caseína, por meio de reações entre sulfidril-dissulfeto. Com o alívio da pressão, moléculas desnaturadas de α -la e β -lg que não interagiram com outras moléculas podem reestruturar-se novamente a um estado próximo ao estado nativo. Esta similaridade sugere fortemente que as reações sulfidril-dissulfeto ocorra apenas durante e não após o tratamento, uma vez que após o tratamento o grupo sulfidril não está mais disponível para reação.

Já a fração soroalbumina bovina (BSA) tem um comportamento bastante estável a tratamentos de alta pressão isostática (HAYAKAWA et al., 1996; LOPEZ-FANDINO et al., 1996). De acordo com o estudo de HAYAKAWA et al. (1996), a conformação da BSA

manteve-se relativamente estável quando pressurizada a até 400 MPa; isto pode ser explicado pelo alto número de pontes dissulfeto (17 pontes) que estabilizam a estrutura tridimensional da BSA. Já GALAZKA et al. (1999) descreveram uma diminuição na hidrofobicidade de uma solução de BSA (5 mg/mL) quando submetida a tratamento de 600 MPa por 20 minutos.

HAYES et al. (2005) relataram que o tratamento de HUAP causa extensa desnaturação de β -lactoglobulina e que a intensidade aumenta com o aumento da pressão aplicada. Os autores encontraram desnaturação de 10% a 150 MPa, 42% a 200 MPa e 56% a 250 MPa. Por outro lado, a α -lactoalbumina apresenta bastante estabilidade e independe do nível de pressão aplicado (aproximadamente 10% a 150 MPa, 200 MPa e 250 MPa).

Segundo HAYES et al. (2005), o nível de desnaturação foi consideravelmente maior que a desnaturação esperada para tratamentos térmicos, considerando dados existentes na literatura que avaliaram o efeito de diferentes níveis de tratamento térmico sobre a β -lg. DATTA et al. (2005) reportaram também um aumento significativo de desnaturação de β -lg tratada por HUAP *versus* leite mantido em uma mesma temperatura mas sem o efeito de homogeneização.

Possivelmente existe influência na forma de medida da desnaturação proteica uma vez que HAYES & KELLY (2003) relataram não haver alteração no valor de nitrogênio não caséico (NNC) de amostras submetidas a HUAP de até 200 MPa; e HUMBERT et al. (1980) encontraram resultados variados para o mesmo tipo de medida.

BOUAQUINA et al. (2006) encontraram resultado similar, ou seja, nenhuma desnaturação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em solução de isolado proteico de soro submetido a tratamento HUAP. Por outro lado, SUBIRADE et al. (1998) demonstraram mudanças na estrutura terciária e quaternária de β -lg submetida a HUAP variando de 100 MPa a 1000 MPa, sendo que as interações eletrostáticas estabilizadoras foram diferentes antes e após o tratamento.

7. Propriedades funcionais e tratamento de ultra alta pressão

Proteínas e polissacarídeos são duas das principais macromoléculas encontradas em ingredientes de uma larga variedade de produtos. Estes biopolímeros têm um papel significativo na estrutura, estabilidade e textura de vários alimentos por meio de seu comportamento de agregação e geleificação (GALAZKA et al., 1999). As propriedades

funcionais de proteínas influenciam na qualidade e nos atributos organolépticos dos alimentos (MESSENS et al., 1997).

A importância das proteínas, principalmente das proteínas do soro, como um ingrediente alimentar, é crescente. Atualmente, seu uso é limitado a suas características funcionais intrínsecas. Porém, sua utilização poderia ser ampliada se suas propriedades funcionais fossem melhoradas a fim de atender novas necessidades. Melhorias nas propriedades funcionais de proteínas podem ser conseguidas por procedimentos que alterem a estrutura proteica. (PITTIA et al., 1996).

Tratamentos de alta pressão influenciam especificamente as propriedades funcionais das proteínas através do rompimento e restabelecimento de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas e separação de pares iônicos. Estas mudanças dependem da estrutura da proteína, nível de pressão, temperatura, pH, força iônica, composição do solvente e concentração da proteína (LOPEZ-FANDINO, 2006).

Considerando o efeito do tratamento UAP nas proteínas do leite, quer seja a fração caseína ou na fração de proteínas do soro, estas alterações com certeza estarão refletidas na funcionalidade das mesmas no produto tratado. É importante ressaltar que durante a pesquisa bibliográfica realizada não foi encontrado nenhum estudo na literatura seguindo a mesma lógica realizada no presente estudo, ou seja, processar o leite e a partir daí extrair proteínas com conformação e funcionalidades específicas. A maior parte dos estudos processou soluções de concentrados ou isolados proteicos e verificou alterações na estrutura das proteínas destas soluções.

7.1. Solubilidade

GAUCHERON et al. (1997) demonstraram um aumento substancial na capacidade de retenção de água pelas proteínas de leite em pó reconstituído tratado a alta pressão isostática. Este aumento foi intenso até pressões de 250 MPa e então se tornou praticamente constante.

MOLINA et al. (2001) estudaram a variação na solubilidade de soluções de isolado proteico de soja submetidos a tratamentos de alta pressão isostática a 200 MPa, 400 MPa e 600 MPa; os autores encontram diminuição da solubilidade em pH 7,5 para os níveis de tratamento de 400 MPa e 600 MPa, mas nenhuma alteração estatisticamente significativa em pH 6,5.

A proteína 11S isolada de soja perde solubilidade em tratamentos de HUAP superiores a 150 MPa por causa da desnaturação e agregação da proteína. A estrutura proteica foi modificada causando exposição de sítios hidrofóbicos e a formação de pontes dissulfeto (FLOURY et al., 2002). Já BOUAOUINA et al. (2006) não encontraram variação na solubilidade da β -lactoglobulina quando uma solução a 3% de isolado proteico de soro foi tratada em HUAP nos níveis de 50 MPa a 300 MPa.

7.2. Aeração

A capacidade de formação de espuma e a estabilidade da espuma formada por uma solução contendo 0,2mg/mL de β -lactoglobulina nativa tratada em alta pressão isostática foi avaliada por PITTIA et al. (1996). Os resultados demonstraram que o aumento da pressão isostática causou a diminuição gradativa na capacidade de formação de espuma.

IBANOGLU & KARATAS (2001) relataram um aumento na capacidade de formação de espuma de uma solução de isolado proteico de soro (1% p/p) submetido a tratamento isostático de 150-450 MPa, sendo o efeito maior quanto maior o nível de pressão aplicada. Por outro lado a estabilidade da espuma aumentou até o nível de 300 MPa e a 450 MPa voltou ao nível obtido com a solução não processada.

Entretanto, avaliando o efeito de alta pressão isostática variando de 0-800 MPa sobre uma solução de β -lactoglobulina (0,15%), IBANOGLU (2001) relatou que não ocorreu nenhuma alteração na capacidade de formação de espuma e na estabilidade da espuma do sistema.

BOUAOUINA et al. (2006) constataram que uma solução de isolado proteico de soro submetida a tratamento de HUAP de 300 MPa não apresentou alteração na tensão interfacial com as bolhas de ar, entretanto houve melhora na cinética de adsorção. Os autores relacionam esta melhora à diminuição do tamanho de partículas, que melhora a mobilidade na fase aquosa, e a uma maior exposição dos sítios hidrofóbicos. No mesmo estudo os autores relatam aumento na capacidade de formação de espuma e na estabilidade da espuma formada para a solução tratada em HUAP em relação à solução não homogeneizada.

7.3. Emulsificação

PITTIA et al (1996) estudaram a capacidade emulsificante de soluções de diferentes concentrações de β -lactoglobulina (0,3 – 1,0 – 1,5 mg/mL), submetidas a diferentes níveis de pressão isostática (0 - 300 – 600 – 900 MPa) misturada a 10% (v/v) com óleo. Foi reportada uma diminuição gradativa da capacidade de emulsificação com o aumento da pressão para a solução contendo 0,3mg/mL. Para as demais soluções o tratamento não alterou a força de emulsificação.

Emulsões de óleo em água preparadas com soluções previamente tratadas por pressão isostática (até 800 MPa) de concentrado proteico de soro ou β -lactoglobulina como agente emulsificante mostraram uma maior amplitude do tamanho das gotas do que as emulsões preparadas com as proteínas não submetidas à pressurização. No caso da emulsão com β -lactoglobulina, a eficiência e, principalmente, a estabilidade da emulsão foi reduzida com o incremento da pressão aplicada e do tempo de tratamento (GALAZKA et al., 1996; GALAZKA et al., 1995b).

Por outro lado, DENDA & HAYASHI (1992) demonstraram que ovalbumina e proteínas de soja submetidas a tratamento de alta pressão isostática também melhoraram as propriedades emulsificantes de ambas.

MOLINA et al. (2001) relataram que tratamento isostático de alta pressão de uma solução de isolado proteico de soja (0,25% p/p) aumenta o índice de atividade emulsificante (IAE) do sistema para pressões a partir de 400 MPa. No mesmo estudo os autores relataram que pressões até 600 MPa não alteraram o índice de estabilidade da emulsão (IEE).

A influência da alta pressão isostática (até 250 MPa por 20 min) na propriedade emulsificante da globulina 11S de *Vicia faba* a pH 8,0 foi investigada em sistemas contendo os polissacarídeos sulfatados ι -carragena (ι -CAR) e κ -carragena (κ -CAR). As emulsões obtidas geraram gotículas substancialmente maiores que aquelas obtidas com a proteína nativa sendo constatada, conseqüente, a diminuição na capacidade emulsificante e na estabilidade da emulsão (GALAZKA et al., 1999).

DESRUMAUX & MARCAND (2002) submeteram uma mistura de óleo de girassol 20% e uma 80% de uma solução de concentrado proteico de soro (1,5% p/p) a tratamento de HUAP variando de 20 MPa a 350 MPa. Os autores relataram alteração na conformação das proteínas e conseqüente modificação nas propriedades emulsificantes das mesmas. O melhor resultado de emulsificação foi obtido para o tratamento de 100 MPa.

Referências Bibliográficas

- ANEMA, S. G.; LOWE, E. K.; STOCKMANN, R. Particle size changes and casein solubilisation in high pressure treated skim milk. **Food Hydrocolloids**, v.19, p.257–267, 2005.
- BALNY, C.; MASSON, P.; TRAVERS, F. Some recent aspects of the use of high pressure for protein investigations in solutions. **High Pressure Research**, v. 2, p. 1-28, 1989.
- BOUAOUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v.16, p. 275-284, 2006.
- BRASIL. EMPRAPA. **Dados da produção mundial e nacional de leite**. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela0211.php>>. Acesso em 21 nov. 2006.
- BRASIL. EMPRAPA. **Dados da produção mundial e nacional de leite**. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/producao/dados2002/producao/2.30.htm>>. Acesso em 21 nov. 2006.
- CAMPOS, F. P.; DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. The use of high-pressure technology in food processing. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 351-357, 2002.
- CHEFTEL, J. C. Applications des hautes pressions en technologie alimentaire. **Actual. Ind. Aliment. Agro-aliment.**, v. 108, p. 141-153, 1991.
- DAMODARAM, S. Structure-function relationships of food protein. In: Abstracts of the 1993 IFT-IUFST Basic Symposium Papers. **Food Technology**. Chicago, v. 47, n. 3, p. 72-76, 1993.
- DAMODARAM, S. Amino acids, peptides and proteins. In: Fennema, O. R. (Ed), **Food Chemistry**, Marcel Dekker, New York, p. 321-430, 1996.
- DATTA, N.; HAYES, M. G.; DEETH, H. C.; KELLY, A. L. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 393-399, 2005.
- DE LA FUENTE, M. A.; OLANO, A.; CASAL, V.; JUÁREZ, M. Effects of high pressure and heat treatment on the mineral balance of goat's milk. **Journal of Dairy Research**. v.66, p.65-72, 1999.

- DENDA, A. & HAYASHI, R. Emulsifying properties of pressure treated proteins. In: BALNY, C.; HAYASHI, R.; HEREMANS, K.; MASSON, P. **High pressure and biotechnology**. (Ed). Montrouge: John Libbey Eurotext, 1992. p. 185-192.
- DESOBRY-BANON, S.; RICHARD, F.; HARDY, J. Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 3267-3274, 1994.
- DESRUMAUX, A.; MARCAND, J. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high pressure homogenisation (up to 350 Mpa): effect of pressure on emulsion characteristics. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 263-269, 2002.
- DUFOUR, E.; HUI BON HOA, G.; HAERTLÉ, T. High pressure effects on β -lactoglobulin interactions with ligands studied by fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1206, p. 166-172, 1994.
- DUMAY, E.; KALICHEVSKY, M. T.; CHEFTEL, J. C. High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and the baroprotective effects of sucrose. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, p. 1861-1868, 1994.
- FELIPE, X.; CAPELLAS, M.; LAW, A. J. R. Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 627-631, 1997.
- FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LEGRAND, J. Effect of ultra high pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein stabilized emulsions. **Journal of Food Science**, v.67, n. 9, p.3388–3395, 2002.
- FOX, P. F. & McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: FOX, P. F. **Dairy chemistry and Biochemistry**. (Ed). London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 147-238.
- FUTENBERGER, S.; DUAMY, E.; CHEFTEL, J. C. Pressure-induced aggregation of β -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, v. 28, p. 410-418, 1995.
- GALAZKA, V. B; LEDWARD, D.; Developments in high pressure food processing. **Food Technology International Europe**, v. 12, p. 123-125, 1995.
- GALAZKA, V. B.; LEDWARD, D. A.; DICKINSON, E.; LANGLEY, K. R.; High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1341-1343, 1995b.

- GALAZKA, V. B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D. A. Effect of high pressure on the emulsifying behavior of β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 2, p. 213-219, 1996.
- GALAZKA, V. B.; SMITH, D.; LEDWARD, D. A.; DICKINSON, E.; Complexes of serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. **Food chemistry**, v. 64, i.3, p. 303-310, 1999.
- GAUCHERON, F.; FAMELART, M. H.; MARIETTE, F.; RAULOT, K.; MICHEL, F.; LE GRAET, Y. Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 439-447, 1997.
- GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 50-60, 1994.
- GUERZONI, M. E.; VANININI, L.; CHAVES LOPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GIANOTTI, A. Effect of high pressure homogenisation on microbial and physico-chemical characteristics of goat cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 851-862, 1999.
- HARTE, F.; LUEDECKE, L.; SWANSON, B.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Low fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. **Journal of Dairy Science**, v.86, p. 1074–1082, 2003.
- HAYAKAWA, I.; LINKO, Y.; LINKO, P. Mechanism of High Pressure Denaturation of Proteins. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 29, n. 8, p. 756-762, 1996.
- HAYASHI, R.; KAWAMURA, Y.; KUNIGI, S. Introduction of high pressure to food processing : preferential proteolysis of β -lactoglobulin in milk whey. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1107-1108, 1987.
- HAYASHI, R. Utilization of pressure in addition to temperature in food science and Technology. In: BALNY, C.; HAYASHI, R.; HEREMANS, K.; MASSON, P. **High pressure and biotechnology**. (Ed). Montrouge: John Libbey Eurotext, 1992. p. 185-192.
- HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy research**, V.70, p.297-305, 2003.

- HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. **Journal of Dairy research**, V.72, p.25-33, 2005.
- HENDRICKX, M.; LUDI KHUYZE, L.; VAN DEN BROEK, I.; WEEMAES, C. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 197–203, 1998.
- HEWEDI, M. M.; MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. Recovery of milk protein by ethanol precipitation. **Irish Journal of Food Science and Technology**, v.9, p. 11-23, 1985
- HUMBERT, G.; DRIOU, A.; GUERIN, J.; ALAIS, C. Effets de l'homogénéisation à haute pression sur les propriétés du lait et son aptitude à la coagulation enzymatique. **Le lait**, v. 60, p. 574-594, 1980.
- HUPPERTZ, T.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Effects of high pressure on constituents and properties of milk. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 561-572, 2002.
- HUPPERTZ, T.; GROSMAN, S.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Heat and ethanol stabilities of high pressure treated bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 125-133, 2004.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Properties of casein micelles in high pressure treated bovine milk. **Food Chemistry**, v. 87, p. 103-110, 2004b.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. High pressure induced denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 489-495, 2004c.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KRUIF, K. G.; KELLY, A. L. High pressure induced changes in bovine milk proteins: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 593-598, 2006.
- IBANOGLU, E. High pressure effect on foaming properties of β -lactoglobulin and dextran sulfate mixture. **Nahrung/Food**, v.45, n.5, p.342-346, 2001.
- IBANOGLU E.; KARATAS, S. High pressure effect on foaming behaviour of whey protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v.47, p.31-36, 2001.
- JOHNSTON, D. E.; AUSTIN, B. A.; MURPHY, R. J. Effects of high hydrostatic pressure on milk. **Milchwissenschaft**, v. 47, n. 12, p. 760-763, 1992.
- JOHNSTON, D. E.; RUTHERFORD, J. A.; MCCREDY, R. W. Ethanol stability and chymosin induced coagulation behaviour of high pressure treated milk. **Milchwissenschaft**, v.57, n.7, p. 363-366, 2002.

- KARLESKIND, D.; LAYE, I.; MORR, C. V.; SCHENZ, T. W. Emulsifying properties lipid-reduced, and calcium-reduced whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 54-58, 1996.
- KHEADR, E. E.; VACHON, J. F.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International dairy journal** v. 12, p.435-446, 2002.
- KIELCZEWSKA, K.; KRUK, A.; CZERNIEWICZ, M.; WARMINSKA, M.; HAPONIUK, E. The effect of high pressure homogenization on changes in milk colloidal and emulsifying systems. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.12, p.43-46, 2003.
- KIELCZEWSKA, K.; CZERNIEWICZ, M.; MICHALAK, J.; BRANDT, W. The effect of high pressure on nitrogen compounds of milk. **Journal of Physics: Condensed matter**, v.16, p.1067-1070, 2004.
- LANCIOTTI, R.; GARDINI, F.; SINIGAGLIA, M.; GUERZONI, M. E. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters of Applied Microbiology**, v. 22, p. 165-168, 1996.
- LAW, A. J. R.; LEAVER, J.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; PLA, R.; GUAMIS, B. Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 2523-2530, 1998.
- LIAO, S. Y.; MANGINO, M. E. Characterization of the composition, physicochemical and functional properties of acid whey proteins concentrates. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1033, 1987.
- LOPEZ-FANDINO, R.; CARRASCOSA, A. V.; OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese making properties of raw milk. **Journal of Dairy Science** v.79, p.924-936, 1996.
- LOPEZ-FANDINO, R.; OLANO, A. Effects of high pressure combined with moderate temperature on the rennet coagulation properties of milk. **International Dairy Journal**, v. 8, p.623-627, 1998.
- LOPEZ-FANDINO, R.; DE LA FUENTE, M. A.; RAMOS, M.; OLANO, A. Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurized milks from different species. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p.69-78, 1998b.

- LOPEZ-FANDINO, R. High pressure induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. **International Dairy Journal**, v. 16, p.1119-1131, 2006.
- LUDIKHUYZE, L. R.; CLAYES, W. L.; HENDRICKX, M. E. Effect of temperature and/or pressure on lactoperoxidase activity in bovine milk and acid whey. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p.625-637, 2001.
- LUPANO, C. E.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Gelling properties of whey protein isolate: influence of calcium removal by dialysis or diafiltration at acid or neutral pH. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 27, p. 615-628, 1992.
- MASSON, P. Pressure denaturation of proteins. In: BALNY, C.; HAYASHI, R.; HEREMANS, K.; MASSON, P. **High pressure and biotechnology**. (Ed). Montrouge: John Libbey Eurotext, 1992. p. 89-99.
- McCRAE, C. H.; LAW, A. J. R.; LEAVER, J. Emulsification properties of whey protein in their natural environment: effect of whey protein concentration at 4 and 18 milk fat. **Food hydrocolloids**, v. 13, p. 389-399, 1999.
- MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 4, p. 107-112, 1997.
- MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulin. **Food hydrocolloids** v.15, p.263-269, 2001.
- MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. P.; VAN-BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1715-1718, 1985.
- MOZHAEV, V. V.; HEREMANS, K.; FRANK, J.; MASSON, P.; BALNY, C. High pressure effects on protein structure and function. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 24, p. 81-91, 1996.
- MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. Assessment of the functional properties of milk protein products. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 209, p. 3-11, 1983.
- MUSSA, D. M.; RAMASWAMY, H. S. Ultra high pressure pasteurisation of milk : kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 30, n. 6, p. 551-557, 1997.

- NEEDS, E. C.; STENNING, R. A.; GILL, A. L.; FERRAGUT, V.; RICH, G. T. High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n.1, p. 31-42, 2000.
- NEEDS, E. C.; CAPELLAS, M.; BLAND, A. P.; MANOJ, P.; MACDOUGAL, D.; PAUL, G. Comparison of heat and pressure treatments of skim milk, fortified with whey protein concentrate, for set yoghurt preparation: effects on milk proteins and gel structure. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 329-348, 2000b.
- ORLIEN, V.; KNUDSEN, J. C.; COLON, M.; SKIBSTED, L.H. Dynamics of casein micelles in skim milk during and after high pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 98, p. 513-521, 2006.
- PHILLIPS, M. C. Protein conformation at ligand interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. **Food Technology**, v. 35, n. 1, p. 50-57, 1981.
- PHILLIPS et al. Standardized procedure for measuring foaming properties of 3 proteins. **Journal of Food Science** v.55, n.5, p.1441-1453, 1990.
- PITTIA, P.; WILDE, P. J.; HUSBAND, F. A.; CLARK, C. C. Functional and structural properties of β -lactoglobulin as affected by high pressure treatment. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1123-1128, 1996.
- REGNAULT, S.; THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: effects on casein micelle size distribution. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 55-68, 2004.
- SANDRA, S.; DALGLEISH, D.G. Effects of ultra high pressure homogenisation and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1095-1104, 2005.
- SCHRADER, K.; BUCHHEIM, W.; MORR, C. V. High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. 1. High pressure dissolution of colloidal calcium phosphate in heated milk systems. *Nahrung* 41 133-138. 1997.
- SCOLLARD, P. G.; BERESFORD, T. P.; NEEDS, E. C.; MURPHY, P. M.; KELLY, A. L. Plasmin activity, β -lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk. **International Dairy Journal** v.10, p.835-841, 2000.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais das proteínas e alimentos proteicos. In: SGARBIERI, V. C. (Ed). **Proteínas em Alimentos Proteicos**. Campinas: Ed Varela, 1996. p. 9-334.

- SGARBIERI, V. C. **Propriedades Funcionais de Proteínas em Alimentos**. Bol. SBCTA. 1998. v. 32, n. 1, p. 105-126.
- SHIBAUCHI, Y.; YAMAMOTO, H.; SAGARA, Y. Conformational change of casein micelles by high-pressure treatment. In: BALNY, C.; HAYASHI, R.; Heremans, K.; MASSON, P. (Ed.). **High Pressure Biotechnology**. London: John Libbey Eurotext, 1992. V. 224, p. 239-242.
- SUBIRADE, M.; LOUPIL, F.; ALLAIN, A. F.; PAQUIN, P. Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of β -lactoglobulin and on its conformational properties as determined by fourier transform infrared spectroscopy. **International Dairy Journal**, v.8, p.135-140, 1998.
- TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; SALDO, J.; GERVILLA, R.; GUAMIS, B. Applications of high hydrostatic pressure on milk and dairy products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.3, p.295–307, 2002.
- WAGNER, J. R. Propriedades superficiais. In: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Pilosof, A. M. R.; Bartholomai, G. B. (eds) Programa Iberoamericano de ciencia y tecnologia para el desarrollo – CYTED, Buenos Aires, p. 41-74, 2000.
- WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **International Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.
- ZOBRIST, M. R.; HUPPERTZ, T.; UNIACKE, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. High pressure induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p.655-662, 2005.

CAPÍTULO 1 – Efeito do Processamento de Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) nas Propriedades Físico-químicas de Leite.

Resumo

O uso de tratamentos alternativos ao tratamento térmico tem sido largamente avaliado. O uso da alta pressão em equipamentos do tipo isostático e de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) são opções viáveis e causam uma série de alterações na estrutura e propriedades da fração proteica do leite. Leite cru desnatado foi submetido a 3 níveis de homogeneização a ultra alta pressão (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa) e os parâmetros do processo e alterações físico-químicas (pH, estabilidade a precipitação por álcool, luminosidade, desnaturação de proteínas do soro, hidrofobicidade e viscosidade) do leite foram avaliadas. O processo apresentou boa repetibilidade e o aumento de temperatura de no máximo 55°C notado é consistente com os dados existentes na literatura. As medidas de pH e nitrogênio não proteico (NNP) não apresentaram alterações estatisticamente significativas para nenhum dos níveis de pressão aplicados. Estabilidade a precipitação com álcool, luminosidade e hidrofobicidade apresentaram aumento a partir de 100 MPa. A desnaturação de proteínas do soro, avaliada pela quantificação de nitrogênio não caseíco (NNC), ocorreu somente a partir de 200 MPa. Enquanto a viscosidade apresentou alteração somente no nível de 300 MPa. O tratamento de HUAP alterou características físico-químicas de leite desnatado, configurando-se como uma tecnologia capaz de alterar as características de funcionalidade de proteínas do leite, dando origem a ingredientes potencialmente novos e com características diferentes dos ingredientes existentes.

Summary

The use of alternatives to heat treatment has been extensively studied in the last years. Among the options, the high pressure treatments using, either the high hydrostatic pressure either the ultra high pressure homogenization (UHPH), are viable options and both of them cause modifications in the structure and properties of the milk protein fraction. Raw skimmed milk was submitted to 3 pressure levels (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa), the processing parameters and the modifications on milk physical-chemistry (pH, stability for alcohol precipitation, lightness, whey protein denaturation, hydrophobicity and viscosity) has been evaluated. The processing presented good repeatability and the maximum temperature increase were 55°C, which is consistent with existing data. The measurements of pH and non-protein nitrogen (NPN) did not present any statistically significant difference at any of the applied pressure levels. Ethanol stability, lightness (L^*) and hydrophobicity increased at 100 MPa to 300 MPa. Whey protein denaturation, evaluated through non-casein nitrogen (NCN), occurred only at 200 MPa to 300 MPa. And the viscosity just changed at 300 MPa. UHPH causes some modification on some physical-chemistry characteristics of skimmed milk, being able to modify milk protein functionality and possibly originating new ingredients with different characteristics than the existing ones.

1. Introdução

O uso de ruminantes para a produção de leite tem sido realizado a mais de 10.000 anos, e tanto o leite como os derivados lácteos são hoje parte importante na dieta da população mundial. Facilitar a conversão do leite em seus derivados é também de crucial importância para a humanidade, e principalmente para as indústrias (HUPPERTZ et al., 2006).

Os efeitos do tratamento térmico nas proteínas do leite têm sido extensivamente estudados a mais de 50 anos (FOX & McSWEENEY, 1998). O uso de tratamentos de alta pressão como processo alternativo ao tratamento térmico tem se difundido nos últimos anos. A principal vantagem preconizada é a manutenção de aroma e sabor mais próximos do produto in natura.

O uso de alta pressão como forma de preservação de alimentos remonta ao início do século, com o uso de equipamentos estáticos como homogeneizadores. O primeiro produto comercial tratado por alta pressão isostática surgiu no Japão em 1991, onde atualmente vários produtos são processados com esta tecnologia: sucos de fruta, geléias, molhos, arroz, bolos e sobremesas (TRUJILLO et al., 2002).

Além da destruição microbiana, os efeitos da alta pressão na estrutura das proteínas e no equilíbrio de minerais, sugerem diferentes aplicações em produtos lácteos (TRUJILLO et al., 2002). Tratamentos de alta pressão influenciam especificamente as propriedades físico-químicas e funcionais de proteínas através da ruptura e recuperação de pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas e iônicas. Estas alterações dependem da estrutura da proteína, do nível de pressão, da temperatura, pH, força iônica e concentração da proteína (LOPEZ-FANDINO et al., 2006).

Já se sabe que quando o leite é submetido a pressões superiores a 100 MPa as micelas de caseína são desintegradas em unidades menores e com maior potencial de agregação (LOPEZ-FANDINO et al., 1998). Além disso ocorre a desnaturação de parte das proteínas do soro e alteração nas frações de nitrogênio (KIELCZEWSKA et al., 2004; SCOLLARD et al., 2000). O resultado disso se reflete em alterações de diversas características físico-químicas do leite: pH, viscosidade, luminosidade, hidrofobicidade e estabilidade (JOHNSTON et al., 1992; DESOBRY-BANON et al., 1994; MUSSA & RAMASWAMY, 1997; JOHNSTON et al., 2002; HARTE et al., 2003).

Mais recentemente a tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) tem sido desenvolvida como alternativa tanto ao tratamento térmico como ao processo isostático de alta pressão.

A homogeneização a ultra alta pressão segue o mesmo princípio da homogeneização tradicional, utilizada sobretudo para evitar a separação de gordura, porém, utilizando pressões significativamente maiores (HAYES & KELLY, 2003).

A HUAP tem sido proposta como alternativa efetiva para a pasteurização de leite e provavelmente compartilha alguns mecanismos de ação com o tratamento isostático. Todavia, a dinâmica do processo das duas tecnologias não é similar (GUERZONI et al., 1999). Portanto, é possível que também as alterações na estrutura das proteínas ocorra de maneira diferenciada, resultando em alterações e efeitos também diferenciados.

PAQUIN (1999) e FLOURY et al. (2002) demonstraram mudanças na estrutura e ou característica de proteínas submetidas a tratamento de HUAP. SUBIRADE et al. (1998) sugerem que a arquitetura da β -lactoglobulina submetida a tratamento de HUAP é modificada e mantida por interações diferentes antes e após o tratamento. HUMBERT et al. (1980) estudaram as propriedades de leite submetido a tratamento de HUAP e sua aptidão à coagulação enzimática.

Apesar de alguns avanços, ainda existe uma quantidade pequena de trabalhos sobre a utilização desta tecnologia (SANDRA & DALGLEISH, 2005). Por isso o objetivo deste capítulo é avaliar o efeito do tratamento de HUAP nas seguintes características físico-químicas de leite desnatado: pH, estabilidade a precipitação por álcool, luminosidade, desnaturação de proteínas do soro, hidrofobicidade e viscosidade.

2. Materiais e Métodos

2.1. Matéria-prima

Foi utilizado leite cru desnatado (0,5% MG) obtido sempre na Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas, Jaguariúna, SP. O leite foi recolhido na manhã do mesmo dia de cada processamento e mantido em estocagem refrigerada (8°C) até o momento de sua utilização.

2.2. Processamento do Leite

O leite foi processado em equipamento de homogeneização contínuo do tipo homogeneizador de Ultra Alta Pressão, modelo nG7400H:350 fabricado por Stansted Fluid Power Ltda., Essex, Inglaterra.

O processo consistiu em bombear o produto através de uma válvula de homogeneização com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados, a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min.

Para facilitar o processo foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, que permitia alternar alimentação com água e com produto. O processo foi sempre iniciado com a circulação de água, com o intuito de eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão no nível desejado. Atingido o equilíbrio, a válvula de alimentação de água foi fechada e a de produto aberta.

Em todos os processamentos o leite desnatado foi retirado da refrigeração e deixado a temperatura ambiente durante o preparo do equipamento e materiais necessários para a coleta de amostras. Este período foi suficiente para que o leite atingisse a temperatura desejada de 20 a 25°C. O leite foi processado nos níveis de pressão predeterminados (0 MPa, 100 MPa, 200 MPa ou 300 MPa) e resfriado em trocador de calor existente no mesmo equipamento, até uma temperatura aproximada de 30°C.

As amostras foram coletadas em garrafas de vidro com tampa, resfriadas e mantidas sob refrigeração (8 – 10°C) até o momento de cada análise.

Cada processo foi monitorado com termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer,

posicionados em 4 pontos : entrada do produto, entrada da válvula de homogeneização, saída da válvula de homogeneização e saída do trocador de calor.

Ao fim de cada processo o equipamento foi higienizado pelo enxágüe com água, seguido de soda 2,5%, novamente enxaguado com água, e finalmente preenchido com álcool 70% (v/v), que foi mantido durante pelo menos 24 horas dentro do equipamento.

Foi realizada triplicata de processo em cada nível de pressão avaliado.

2.3. Determinação da composição centesimal

Os leites submetidos a cada nível de tratamento foram analisados em triplicata para determinação de sua composição centesimal. A quantificação de umidade, resíduo mineral (cinzas) e nitrogênio total foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no A.O.A.C. (1980). Os lipídios totais foram determinados pelo método descrito por BLIGH & DYER (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (na proporção 10:20:8, respectivamente) para extração dos lipídios. Os carboidratos foram determinados por diferença, subtraindo de 100% a soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

2.4. pH

As amostras coletadas antes e após os tratamentos tiveram seu pH monitorado no mesmo dia do processo, e em mais 2 dias subsequentes (D_0 , D_1 e D_2 , respectivamente).

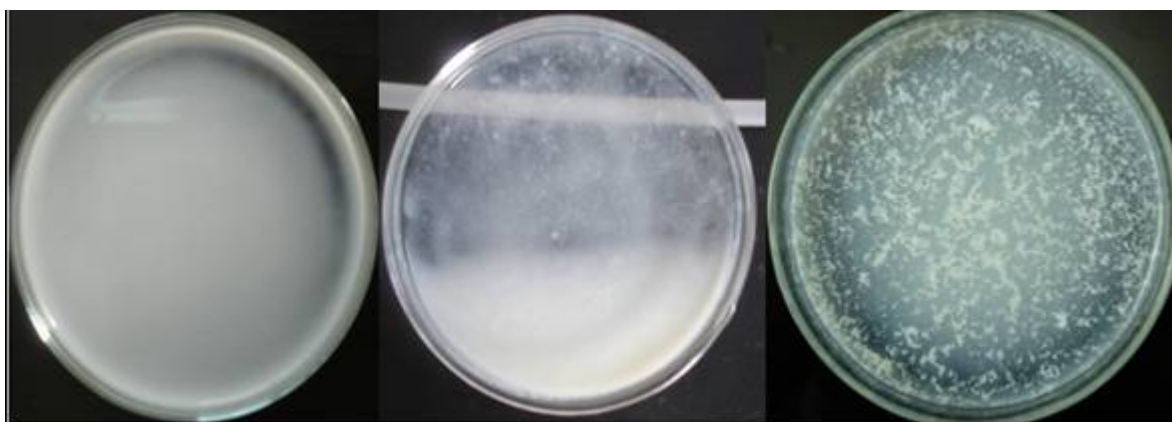
A metodologia foi aplicada segundo a A.O.A.C. (1997) e o equipamento utilizado foi um phmetro METTLER TOLEDO tipo MP120B calibrado diariamente antes das análises. Cada amostra foi analisada com triplicata de leitura e triplicata de processo.

2.5. Estabilidade ao álcool

A metodologia usada para determinar a estabilidade das proteínas através de sua precipitação por álcool a diferentes concentrações foi realizada conforme metodologia descrita por HUPPERTZ et al. (2004). A análise consiste em pipetar 2 mL de leite em placa de Petri limpa, em seguida pipetar na mesma placa 2 mL de solução de álcool etílico neutralizado (pH 7,0) em diferentes concentrações (68, 72, 75, 80 e 85°GL). A

mistura deve ser agitada suavemente e a formação de grumos ou flocos avaliada visualmente sobre fundo negro.

Os resultados foram classificados em 3 níveis apresentados na figura 1.1.



Nível 0

Nível 1

Nível 2

Figura 1.1: Nível de precipitação

Nível 0: Nenhuma precipitação aparente

Nível 1: Precipitação suave e com grumos pequenos

Nível 2: Precipitação intensa e com grumos grandes

As amostras coletadas após tratamento em diferentes níveis de homogeneização a ultra alta pressão foram avaliadas no mesmo dia e no dia seguinte ao processamento (D e D+1, respectivamente). Cada amostra foi analisada em duplicata de leitura e triplicata de processo.

2.6. Luminosidade

A análise de cor foi realizada utilizando um espectrofotômetro marca Hunterlab modelo COLORQUEST II. As condições de operação foram: sistema de cor CIEL*a*b*, ângulo de incidência 10°, iluminante D₆₅.

O parâmetro usado para avaliar alterações no leite foi a luminosidade (L*) da amostra. Foram avaliadas amostras provenientes de quatro processamentos distintos e cada amostra foi avaliada em duplicata.

2.7. Desnaturação de Proteínas do Soro

O nível de desnaturação das proteínas foi determinado pela variação na quantidade de nitrogênio solúvel em pH 4.6 (nitrogênio não caséico - NNC) e pela variação na quantidade de nitrogênio não proteico (NNP), conforme realizado por GAUCHERON et al. (1997). A quantificação foi realizada por micro-Kjeldahl segundo metodologia descrita pela A.O.A.C. (1980) e a quantidade de proteína foi obtida pela multiplicação do fator 6,38.

A análise de nitrogênio não caséico consistiu em misturar 10 mL de leite, 75 mL de água, 1 mL de solução ácido acético 10% e 1 mL de solução acetato de sódio 1 N, em condições controladas de temperatura promovendo a precipitação de parte das proteínas do leite. O sobrenadante foi então filtrado em papel Whatman nº 1 e a quantidade de nitrogênio na amostra quantificada por macro-Kjeldahl. O padrão foi realizado com a mistura sem a adição da amostra de leite, conforme descrito pela metodologia IDF nº 29 (1964).

A análise de nitrogênio não proteico foi realizada em cada amostra pela reação de 5 mL leite com 5 mL água e 10 mL de ácido tricloroacético 24%. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman nº 42 e a quantidade de nitrogênio na amostra quantificada por macro-Kjeldahl, conforme descrito por ASCHAFFENBURG & DREWRY (1959).

Cada amostra foi medida em triplicata de análise e em triplicata de processo.

2.8. Hidrofobicidade

A análise foi realizada para quantificar a exposição de sítios hidrofóbicos das amostras tratadas nos diferentes níveis de homogeneização a ultra alta pressão, de acordo com o método de BONOMI et al. (1988).

A análise foi realizada em um espectralfluorímetro de luminescência Perkin Elmer modelo LS-55 com *software* FL Winlab, e consiste em quantificar a fluorescência gerada pela reação entre os sítios hidrofóbicos em exposição na matriz proteica com um agente de fluorescência conhecido como ANS (ácido 8-anilino-1-nafetalenosulfônico). Os parâmetros de fluorescência utilizados foram comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 390 nm e comprimento de onda de emissão (λ_{em}) de 500 nm, ambos medidos em passos de 0,5 nm realizados de 400 a 650 nm.

As amostras de leite processado (1 mL) foram diluídas com uma solução tampão de fosfato de potássio 50 mM até um volume final de 10 mL. Cada solução foi titulada

com soluções de ANS 1.000 $\mu\text{mol/L}$ até que cessasse o aumento de fluorescência. A curva padrão foi feita pela titulação de 10 mL da solução tampão.

O valor considerado de fluorescência foi o mais alto obtido no comprimento de onda de emissão ($\lambda_{\text{em}}=500\text{ nm}$) dentre as diferentes concentrações de ANS em solução (0 a 200 $\mu\text{mol/L}$). Cada amostra foi medida em triplicata de análise e em triplicata de processo.

2.9. Viscosidade

As análises de viscosidade foram realizadas em reômetro digital marca Brookfield, Modelo DV-III, utilizando-se o adaptador para pequenas amostras, *spindle* 18, que, segundo o manual do fabricante, permite medir viscosidades baixas desde 1,3 cP.

As leituras foram realizadas com as amostras mantidas a 25°C, com medidas variando a rotação do *spindle* de 200 a 250 rpm, em intervalos de 10 rpm a cada 30 segundos. O valor de viscosidade da amostra foi definido pela média das medidas.

Cada amostra foi analisada com duplicata de leitura e quadruplicata de processo.

2.10. Tratamento de dados

Todos os resultados encontrados no estudo foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as possíveis diferenças entre médias ($p<0,05$) pelo teste de Tukey (GOMES, 1982), utilizando-se o programa *Statística: Basic Statistics and Tables*.

3. Resultados e Discussão

3.1. Processamento do Leite

Os resultados de controle de temperatura durante as etapas do processo estão apresentados na Tabela 1.1. Os valores representam 3 processos distintos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

Tabela 1.1: Monitoramento das temperaturas durante o processamento de leite desnatado por HUAP

Pressão (MPa)	T1 (°C)	T2 (°C)	T3 (°C)	T4 (°C)
100	23,75 ± 0,74 ^a	26,82 ± 0,99 ^a	48,07 ± 1,21 ^a	26,38 ± 1,75 ^a
200	21,68 ± 0,71 ^a	27,85 ± 1,26 ^a	67,25 ± 1,35 ^b	28,47 ± 1,68 ^a
300	23,67 ± 2,60 ^a	29,45 ± 2,88 ^a	84,88 ± 3,01 ^c	30,32 ± 2,37 ^a

* Média ± Desvio Padrão, letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

T1: Temperatura de entrada do produto

T2: Temperatura do produto antes da válvula de homogeneização

T3: Temperatura do produto após a válvula de homogeneização

T4: Temperatura de saída do produto

Não existe variação significativa ($p < 0.05$) entre as temperaturas T1, T2 e T4 entre os 3 níveis de pressão aplicados, o que demonstra o bom funcionamento do equipamento e a consistência e repetibilidade dos processos.

Conforme esperado, existe diferença estatisticamente significativa entre os processos após a válvula de homogeneização (T3), pois o aumento da pressão gerado pela diminuição do espaço da válvula gera também um aumento de temperatura.

A Figura 1.2 apresenta a variação de temperatura (ΔT) x variação de pressão (ΔP) para os três processos realizados.

O aumento de temperatura apresenta correlação linear com o aumento de pressão ($r^2 = 0,9941$). De acordo com a equação obtida, o aumento de 1 MPa de pressão corresponde a um aumento de 0,177°C, valor próximo aos valores encontrados na literatura. As pequenas variações são causadas pelo tipo de produto e pelas características mecânicas intrínsecas de cada equipamento.

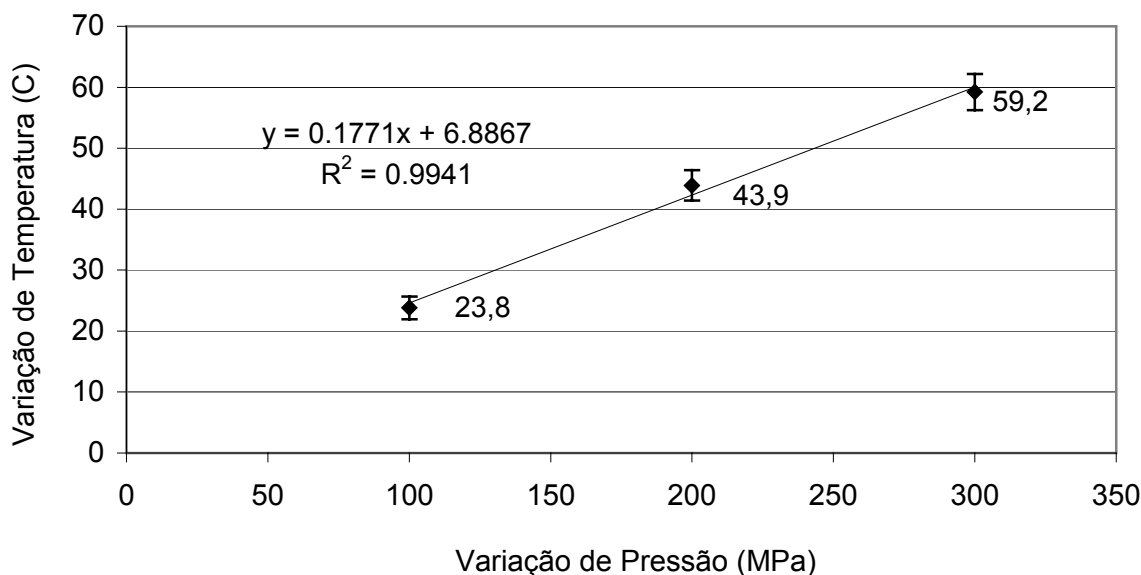


Figura 1.2: Correlação entre variação de pressão (ΔP) e variação de temperatura (ΔT) durante o processamento de leite desnatado por HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Vários autores já haviam descrito aumentos consistentes de temperatura com o aumento de pressão para diferentes produtos. FLOURY et al. (2002) destacaram um aumento de 0,22°C a cada 1 MPa na homogeneização de uma emulsão de proteína de soja, enquanto BOUAOUINA et al. (2006) observaram uma variação de 0,20°C a cada 1 MPa para uma solução de β -lactoglobulina submetida a HUAP. HAYES & KELLY (2003) encontraram variação de 0,18°C para cada 1 MPa em homogeneização de leite integral e HAYES et al. (2005) variação de 0,17°C para cada 1 MPa também em leite integral mas com temperatura de entrada mais alta (45°C) que em seu estudo anterior. DATTA et al. (2005) encontraram variação de 0,21°C a cada 1 MPa.

Este aumento de temperatura está associado em pequena extensão ao aquecimento adiabático e em grande extensão à turbulência, atrito e cavitação gerados pela alta velocidade do fluido na válvula de homogeneização, e que é transmitida ao produto em forma de calor.

A temperatura máxima alcançada durante os processos foi de aproximadamente 85°C após a homogeneização a 300 MPa. Segundo os cálculos realizados o tempo médio de residência do produto entre a saída da válvula de homogeneização e a saída do trocador de calor é de aproximadamente 0,7 segundos (CAMPOS et al., 2002).

O papel do aquecimento nas modificações produzidas por tratamento de homogeneização a alta pressão é incerto, embora o aquecimento seja de duração muito curta na válvula de homogeneização (aproximadamente 10^{-4} segundos). Este fenômeno é muito diferente e envolve um tempo muito inferior que um processo de pasteurização convencional utilizado na indústria, que em geral envolve retenção de pelo menos 10 segundos (BOUAOUINA et al., 2006).

3.2. Determinação da composição centesimal

A Tabela 1.2 apresenta a caracterização centesimal do leite desnatado sem tratamento e após a homogeneização a diferentes níveis de pressão. Os dados apresentados são provenientes de 3 processos distintos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

Tabela 1.2: Composição centesimal de leite desnatado processado em diferentes níveis de HUAP

Pressão (MPa)	Umidade (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)	Carboidrato (%)
0	89,59 \pm 0,02 ^a	2,93 \pm 0,05 ^a	0,48 \pm 0,04 ^a	0,67 \pm 0,03 ^a	6,33 \pm 0,09 ^a
100	89,91 \pm 0,40 ^a	3,05 \pm 0,01 ^a	0,46 \pm 0,05 ^a	0,65 \pm 0,04 ^a	5,93 \pm 0,41 ^a
200	89,98 \pm 0,87 ^a	2,95 \pm 0,18 ^a	0,52 \pm 0,04 ^a	0,66 \pm 0,07 ^a	5,88 \pm 0,71 ^a
300	89,44 \pm 0,22 ^a	2,97 \pm 0,20 ^a	0,47 \pm 0,05 ^a	0,74 \pm 0,01 ^a	6,38 \pm 0,36 ^a

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Não existe variação estatisticamente significativa entre a composição centesimal dos leites submetidos a diferentes níveis de pressão.

Conforme esperado, o processo de homogeneização a alta pressão de leite traz alterações físico-químicas ao leite, mas sem causar variação na composição centesimal.

3.3. pH

O pH é uma das características físico-químicas mais importantes para definir a qualidade de uma matéria-prima e no caso de leite fluido tem estreita relação com possíveis alterações na matriz proteica. Alterações na micela de caseína podem provocar alteração no pH e no equilíbrio de sais, como, por exemplo, cálcio (Ca^{+2}) e fosfato, entre a fração micelar e a fração solúvel.

A Tabela 1.3 apresenta o acompanhamento da variação de pH para os diferentes níveis de tratamento durante 3 dias, sendo D₀ o dia do processamento, D₁ o dia seguinte ao processamento (24 horas) e D₂ dois dias após o processamento (48 horas).

Tabela 1.3: pH do leite desnatado processado em diferentes níveis de HUAP

Pressão (MPa)	D₀	D₁(24 horas)	D₂ (48 horas)
0	6,75 ± 0,04 ^{Aa}	6,73 ± 0,03 ^{Aa}	6,77 ± 0,06 ^{Aa}
100	6,79 ± 0,04 ^{Ab}	6,80 ± 0,09 ^{Ab}	6,84 ± 0,11 ^{Ab}
200	6,81 ± 0,03 ^{Ac}	6,80 ± 0,02 ^{Ac}	6,84 ± 0,02 ^{Ac}
300	6,84 ± 0,03 ^{Ad}	6,85 ± 0,05 ^{Ad}	6,97 ± 0,15 ^{Ad}

* Média ± Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

** Letras maiúsculas comparam medidas na mesma coluna e letras minúsculas comparam medidas na mesma linha.

Apesar de uma aparente tendência em causar um aumento no valor do pH com o aumento do nível de pressão, estatisticamente não existiu variação significativa entre os valores de pH das amostras. Este comportamento também foi válido para o leite analisado 24 e 48 horas após o tratamento.

Em equipamentos de homogeneização de ultra alta pressão, HUMBERT et al. (1980) relataram uma diminuição do pH das amostras variando entre 0.1 a 0.2 após tratamentos de 200 MPa a 600 MPa. Por outro lado KIELCZEWSKA et al. (2003) não constataram nenhuma alteração no valor do pH em leite homogeneizado entre 20 MPa a 140 MPa, assim como SANDRA & DALGLEISH (2005) utilizando leite desnatado também não encontraram nenhuma variação de pH de leite homogeneizado em pressões variando entre 41 MPa e 186 MPa.

A variabilidade do comportamento do pH de leite submetido a tratamento de homogeneização a ultra alta pressão fica evidente quando se compara os estudos de HAYES & KELLY (2003) e Hayes et al. (2005). No primeiro estudo os autores relataram diminuição de 0.33 e 0.34 no pH de leite homogeneizado a 150 MPa e 200 MPa, respectivamente, e associaram esta diminuição de pH ao efeito de lipases endógenas sobre o maior número de glóbulos gerados nestas pressões, principalmente sobre aqueles que não foram efetivamente emulsificados pelas proteínas. Em 2005 os autores relataram diminuição no pH de leite homogeneizado a 150 MPa, mas nenhuma alteração em leite homogeneizado a 200 MPa e 250 MPa e associaram uma maior estabilidade do pH em pressões mais altas devido a inativação das lipases endógenas, embora não tenham esclarecido a variação existente no nível de 200MPa nos dois estudos.

Em equipamentos de alta pressão isostática, JOHNSTON et al. (1992), LOPEZ-FANDINO et al. (1996 e 1998) e HARTE et al. (2003) reportaram que alta pressão variando entre 0 e 600 MPa não causou alteração significativa de pH. Segundo os autores isto se deve ao fato da capacidade dos grupos ácidos, básicos e sais presentes no sistema, restabelecerem o equilíbrio após o término do tratamento, mesmo com alterações estruturais na micela de caseína. Em contrapartida, DE LA FUENTE et al. (1999), KIELCZEWSKA et al. (2004) e ZOBRIST et al. (2005), reportaram aumentos variados de pH com o aumento dos níveis de pressão isostática. Os autores sugeriram que esta variação esteve relacionada com a dissolução do fosfato de cálcio coloidal, que altera o equilíbrio de cargas do sistema. A intensidade desta variação foi dependente de fatores como nível de pressão, temperatura durante o tratamento e composição da matéria-prima. Segundo HUPPERTZ et al. (2002), a passagem de fosfato coloidal para a fase solúvel foi parcialmente reversível com o tempo e a estrutura original recomposta mais rapidamente quanto maior a temperatura de estocagem.

A variação do pH de leite tratado em homogeneização a ultra alta pressão tem sido associado a efeito enzimático, enquanto que em tratamento isostático tem sido associado a variação do estado do fosfato de cálcio entre a fase coloidal e solúvel. No presente estudo não foi encontrada nenhuma alteração no pH, o que sugere que não houve grande alteração na solubilidade do fosfato de cálcio e que a atividade enzimática de lipases endógenas foi pequena devido à sua inativação e/ou devido à pouca quantidade de gordura no sistema uma vez que se utilizou leite desnatado.

No presente estudo o tratamento de homogeneização a alta pressão entre os níveis de 0 e 300 MPa não causa alteração no pH do leite e este comportamento persiste por pelo menos 48 horas após o tratamento. Ou seja, até 300 MPa não deve haver grande perda de Ca^{+2} das micelas e nem alterações no equilíbrio de cargas da proteína.

3.4. Estabilidade ao álcool

A estabilidade das proteínas lácteas é fator largamente utilizado na indústria para avaliar a susceptibilidade de uso da matéria-prima a determinados tratamentos de alta temperatura, principalmente para tratamentos UHT. A precipitação com álcool ocorre pela diminuição da constante dielétrica do meio, diminuindo a ação protetora da κ -caseína e permitindo as micelas se aproximarem e precipitarem. Assim, a alteração da estrutura das micelas é capaz de alterar sua estabilidade à precipitação por álcool.

Neste estudo avaliou-se o efeito do tratamento de homogeneização a alta pressão na estabilidade das proteínas do leite no dia do processamento (D_0) e 24 horas após o mesmo (D_1). As Tabelas 1.4 e 1.5 apresentam os valores obtidos conforme padrão de precipitação apresentado anteriormente na Figura 1.1 do item 2.5.

Em todos os níveis de concentração de álcool aplicados os leites submetidos a tratamentos de homogeneização de alta pressão apresentaram estabilidade igual ou superior ao leite sem tratamento. Esta verificação foi válida tanto para o mesmo dia do tratamento (D_0), como para 24 horas após o tratamento (D_1).

Tabela 1.4: Nível de coagulação de leite desnatado após o processamento por HUAP (D_0)

Proc. 1	68 (°GL)		72 (°GL)		75 (°GL)		80 (°GL)		85 (°GL)	
0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
100	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
200	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Proc. 2	68 (°GL)		72 (°GL)		75 (°GL)		80 (°GL)		85 (°GL)	
0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
100	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2
200	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2
300	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2
Proc. 3	68 (°GL)		72 (°GL)		75 (°GL)		80 (°GL)		85 (°GL)	
0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2
100	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2
200	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2
300	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2

Tabela 1.5: Nível de coagulação de leite desnatado 24 horas após o processamento por HUAP (D_1)

Proc. 1	68 (°GL)		72 (°GL)		75 (°GL)		80 (°GL)		85 (°GL)	
0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0
Proc. 2	68 (°GL)		72 (°GL)		75 (°GL)		80 (°GL)		85 (°GL)	
0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2
100	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2
200	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2
300	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2
Proc. 3	68 (°GL)		72 (°GL)		75 (°GL)		80 (°GL)		85 (°GL)	
0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
100	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
200	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2
300	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2

Nenhum dado foi encontrado na literatura para esta avaliação em processo de homogeneização a ultra alta pressão.

JOHNSTON et al. (2002) demonstraram um efeito negativo do tratamento de alta pressão isostática (200 MPa a 600 MPa) sobre a estabilidade das proteínas do leite quando diferentes quantidades de álcool foram tituladas ao leite em diferentes pHs. Este efeito foi pouco intenso em pHs próximos a neutralidade e maiores quanto mais baixo foi o pH. HUPPERTZ et al. (2004) demonstraram efeito semelhante de diminuição da estabilidade de leite tratado; o leite sem tratamento precipitou somente quando misturado com álcool 80°GL enquanto o leite homogeneizado entre 250 MPa e 600 MPa precipitou em presença de álcool 75°GL. Ambos trabalhos associam a perda de estabilidade ao aumento do nível de cálcio solúvel e a uma diminuição do efeito estabilizante da κ -caseína uma vez que as micelas dissociadas têm maior área superficial que as micelas originais.

Como o efeito da precipitação está relacionado com a alteração da micela de caseína e com a alteração no equilíbrio de Ca^{+2} (HEWEDI et al., 1985), isto pode também explicar o efeito contrário encontrado no presente estudo. Conforme resultados encontrados, os tratamentos realizados não alteraram o pH do sistema e, portanto, poder-se-ia acreditar que o equilíbrio de cálcio coloidal também não tinha sido alterado. Além disso, foi observado um aumento da viscosidade, provavelmente relacionado a incorporação de proteínas do soro na micela de caseína, o que sugere uma proteção ainda maior das micelas de caseína à ação do álcool.

A importância desta constatação tem implicação direta com a viabilidade do processo a nível industrial pois o leite mesmo depois de tratado em alta pressão, deve apresentar estabilidade térmica similar se submetido a tratamento UHT, o que permite a associação de efeitos e provavelmente uma diminuição na temperatura utilizada, uma vez que grande parte da flora será inativada pela alta pressão. Esta constatação pode ser importante em termos de economia de energia e manutenção das características sensoriais do leite.

3.5. Luminosidade

A associação ou desintegração das micelas de caseína pode ser correlacionada com a medida de luminosidade medida do leite. Vários autores correlacionaram a luminosidade e o diâmetro médio das micelas de caseína (ORLIEN et al., 2006;

HUPPERTZ et al., 2004b; NEEDS et al., 2000 e 2000b; MUSSA & RAMASWAMY, 1997; GAUCHERON et al., 1997; DESOBRY-BANON et al., 1994; JOHNSTON et al., 1992 e SHIBAUCHI et al., 1992); quanto menor a luminosidade medida, menor o tamanho das micelas.

A Figura 1.3 apresenta a luminosidade de leite processado em HUAP. Os dados apresentados são provenientes de 3 processos distintos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

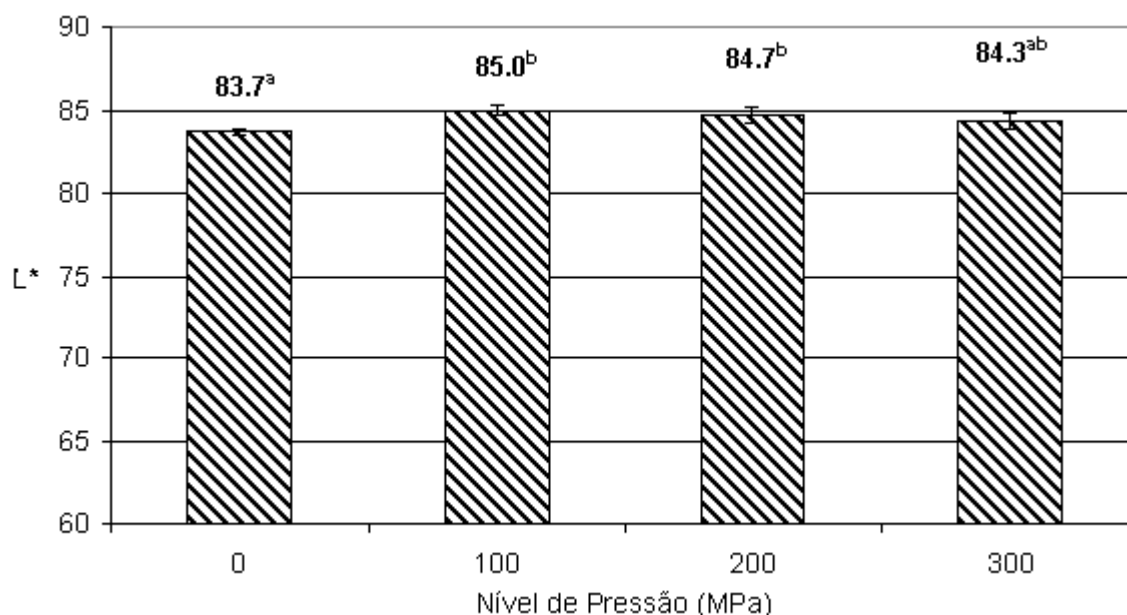


Figura 1.3: Luminosidade de leite processado por HUAP

* Média + Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

O leite apresentou aumento estatisticamente significativo de luminosidade para as pressões de 100 MPa e 200 MPa. Em 300 MPa houve um decréscimo e este valor se aproximou do valor inicial.

No caso de homogeneização a ultra alta pressão, HAYES & KELLY (2003) notaram aumento na luminosidade de leite tratado em ciclo único entre 100 MPa e 200 MPa, variando a luminosidade de 81 para 85, resultado muito semelhante ao encontrado no presente estudo (83 para 85). Os autores encontraram ainda uma ligeira diminuição no diâmetro médio das micelas a partir de 200 MPa. KIELCZEWSKA et al. (2003) e HAYES et al. (2005) também relataram aumento da luminosidade de leite homogeneizado em pressões variando desde 20 MPa até 250 MPa.

Por outro lado SANDRA & DALGLEISH (2005) constataram uma ligeira diminuição no diâmetro das micelas das amostras tratadas a 100 MPa e 200 MPa, mas nenhuma alteração significativa no valor da luminosidade das amostras.

Também para os resultados relatados com o uso de alta pressão isostática o comportamento notado é coerente com a descrição de vários autores. Em pressões entre 0 MPa e 200 MPa foi notado um ligeiro aumento ou nenhuma modificação da luminosidade e/ou diâmetro das micelas (NEEDS et al., 2000, GAUCHERON et al., 1997, DESOBRY-BANON et al., 1994, SHIBAUCHI et al., 1992 e JOHNSTON et al., 1992). Em pressões entre 200 MPa a 300 MPa ocorreu decréscimo de luminosidade de apenas 10%, e em pressões variando de 300 MPa a 600 MPa ocorreu um decréscimo acentuado de luminosidade maior que 20% (NEEDS et al., 2000 e 2000b, SHIBAUCHI et al., 1992 e JOHNSTON et al., 1992). HUPPERTZ et al. (2004b) e MUSSA & RAMASWAMY (1997) descreveram diminuição no valor de L^* para todas as pressões sendo que em 100 MPa a variação é muito pequena. Entre 200 MPa e 400 MPa a luminosidade começa a diminuir mais intensamente e o fenômeno se torna mais intenso quanto maior a pressão aplicada.

Medidas de distribuição de tamanho de partículas revelaram que tratamentos de alta pressão isostática de 100-150 MPa a 20°C induziram um aumento do volume hidrodinâmico da população principal de caseína e uma dissociação limitada das micelas maiores. Tratamento de alta pressão isostática a 200 MPa leva à dissociação micelar, enquanto que em 250 MPa o fenômeno de agregação supera a dissociação anterior. Em pressões mais altas, tamanhos de micela menores foram predominantes (REGNAULT et al., 2004).

A diminuição da luminosidade é causada pela desintegração das micelas originais de caseína e agregação em cadeias menores e irregulares, formadas pela reação dos sítios hidrofóbicos que foram expostos no tratamento (GAUCHERON et al., 1997). Já o aumento notado em pressões menores (100 MPa a 250 MPa) é explicado pela interação entre os poucos fragmentos de micelas de caseína formados e as proteínas de soro desnaturadas com as micelas intactas, originando assim micelas maiores que aquelas obtidas em pressões mais elevadas (ORLIEN et al., 2006).

Segundo ORLIEN et al. (2006) o tratamento de alta pressão isostático causa a agregação das micelas desnaturadas entre si e entre as proteínas de soro. Este comportamento juntamente com os resultados de SANDRA & DALGLEISH (2005) sobre as alterações nas micelas de caseína, permitem explicar os resultados do presente estudo. Em 100 MPa o aumento de L^* notado pode estar relacionado a ligeira

desnaturação de parte das micelas, principalmente κ -CN e α_{s1} -CN, que passam para a fração não coloidal. Em 200 MPa continua a dissociação das micelas de caseína e se inicia a desnaturação de proteínas do soro, sendo que L^* continua maior que o leite sem tratamento. Finalmente em 300 MPa a dissociação das micelas gerada pela alta tensão de cisalhamento, exposição de sítios hidrofóbicos e desnaturação das proteínas do soro causa a agregação das moléculas e novamente uma diminuição no valor de L^* da amostra.

3.6. Desnaturação de Proteínas do Soro

A desnaturação de cada uma das proteínas do soro é comumente determinada pela medição do seu nível na fração solúvel em pH 4.6 e expressa em relação a uma amostra controle.

A Figura 1.4 apresenta o valor obtido de NNC para o leite tratado e em diferentes níveis de homogeneização de alta pressão. Os dados apresentados são provenientes de 3 processos distintos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

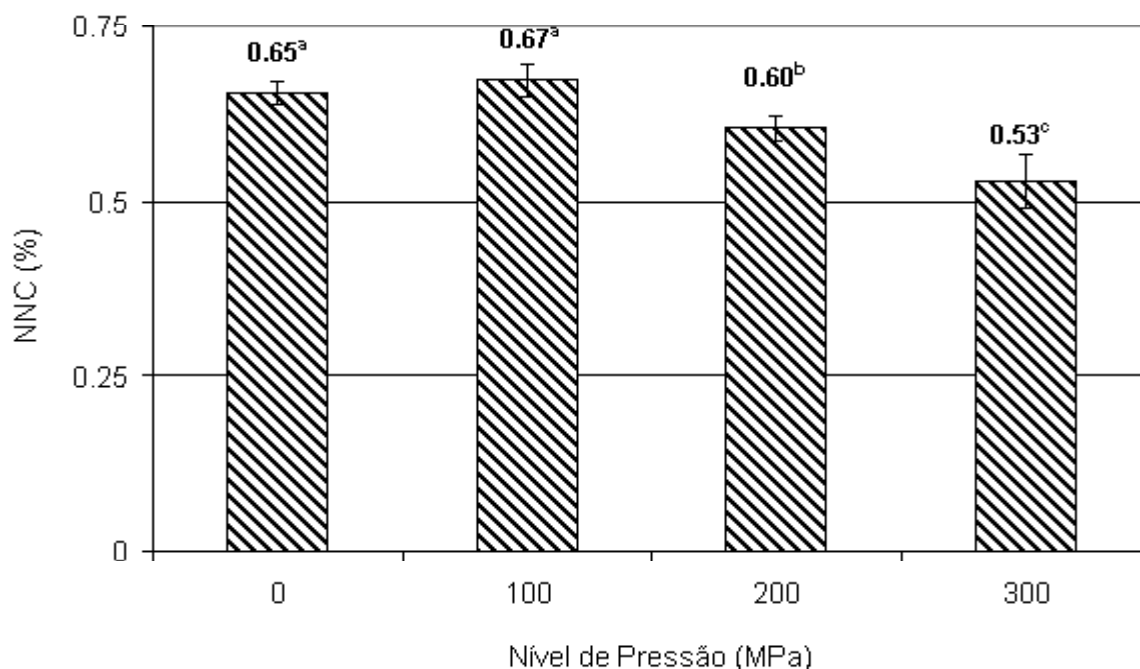


Figura 1.4: Determinação de Nitrogênio Não Caséico (NNC) em leite desnatado processado por HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Constatou-se a diminuição da quantidade de proteínas a partir de 200 MPa, da ordem de 10%, e uma diminuição ainda mais intensa em 300 MPa da ordem de 20%, em relação ao leite sem tratamento.

Com relação a tratamentos de homogeneização a alta pressão os dados na literatura são ainda muito mais escassos. HUMBERT et al. (1980) aplicaram tratamentos de homogeneização a ultra alta pressão para avaliar o efeito sobre a fração proteica e não apenas sobre os glóbulos de gordura. Em seu trabalho demonstraram que leite desnatado submetido a tratamento de 600 MPa apresentou diminuição de aproximadamente 13% no nível de NNC. HAYES et al. (2005) quantificaram a desnaturação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em leite submetido a HUAP nos níveis de 150 MPa, 200 MPa e 250 MPa. Os autores encontraram desnaturação de aproximadamente 10% para a α -lactoalbumina em todos os níveis de homogeneização e aproximadamente 10%, 42% e 56% para a β -lactoglobulina nos níveis 150 MPa, 200 MPa e 250 MPa respectivamente.

Por outro lado, HAYES & KELLY (2003) não constataram nenhuma alteração no valor de NNC em pressões de até 200 MPa.

Segundo vários autores que estudaram a cinética da desnaturação térmica de proteínas do soro (BIKKER et al., 2000; ANEMA & MCKENNA, 1996; KESSLER & BEYER, 1991), a exposição do leite a 85°C por 1 segundo gera uma desnaturação menor que 5%. DATTA et al. (2005) compararam a extensão da desnaturação de β -lactoglobulina em leite tratado por HUAP e por tratamento térmico convencional em diferentes temperaturas, ambos com o mesmo tempo de retenção, e relataram que a desnaturação notada em HUAP é significativamente maior que a de tratamento térmico para qualquer temperatura.

Como os valores encontrados neste estudo são maiores que aqueles descritos na literatura, fica evidente que o efeito da homogeneização a ultra alta pressão causa a desnaturação de proteínas do soro.

Em pressões similares mas com equipamentos do tipo isostático, JOHNSTON et al. (1992) também reportaram desnaturação de proteínas do soro da ordem de 10% para 200 MPa e 20% para 300 MPa. Já GAUCHERON et al. (1997) e NEEDS et al. (2000) encontraram uma desnaturação menos intensa, da ordem de 10% para 100 MPa e 200 MPa. Finalmente LAW et al. (1998) e KIELCZEWSKA et al. (2004) constataram desnaturação de 18,5% a 200 MPa.

Em tratamentos isostáticos de alta pressão, β -lactoglobulina é a proteína do soro mais facilmente desnaturada, e desnaturação apreciável de imunoglobulinas e α -

lactoalbumina somente ocorre a pressões mais elevadas, da ordem de 400 MPa, e particularmente a 50°C (TRUJILLO et al., 2000). A soroalbumina bovina (BSA) é resistente a pressões de até 400 MPa (FELIPE et al., 1997).

Tratamento de leite cru em sistema isostático até 100 MPa não foi suficiente para desnaturar a β -lactoglobulina (LOPEZ-FANDINO et al., 1996; FELIPE et al., 1997; LOPEZ-FANDINO & OLANO, 1998). Pressão isostática de 400 MPa resultou em desnaturação considerável de até 80% de β -lactoglobulina (LOPEZ-FANDINO et al., 1996; LOPEZ-FANDINO & OLANO, 1998; SCOLLARD et al., 2000). Acima de 400 MPa pouco aumento adicional foi notado sobre a degradação da β -lactoglobulina (SCOLLARD et al., 2000).

Apesar de todos estes autores utilizarem o tratamento isostático de alta pressão, é muito provável que a desnaturação notada nos testes realizados são decorrentes da desnaturação da fração de β -lactoglobulina. Segundo NEEDS et al. (2000b) e LOPEZ-FANDINO et al. (1997) o mecanismo de reação entre β -lactoglobulina desnaturada e κ -caseína não é bem explicado para tratamentos sob alta pressão, mas certamente este sistema é diferente da reação que ocorre na desnaturação térmica de β -lactoglobulina. HUPPERTZ et al. (2006) relatam que a maior parte da β -lactoglobulina desnaturada é precipitada junto com as caseínas em pH 4.6, e que uma pequena parte continua na fração solúvel sob a forma de agregados de proteínas do soro ou agregados com frações muito pequenas e não sedimentáveis de caseína.

A Tabela 1.6 apresenta os dados de Nitrogênio Não Proteico (NNP) em leite desnatado submetido a diferentes níveis de HUAP. Os dados apresentados são provenientes de 3 processos distintos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

Tabela 1.6: Determinação de Nitrogênio Não Proteico (NNP) em leite processado em diferentes níveis de HUAP

Pressão (MPa)	NNP (%)
0	0,024 \pm 0,02 ^a
100	0,023 \pm 0,02 ^a
200	0,025 \pm 0,02 ^a
300	0,025 \pm 0,03 ^a

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Nenhuma das amostras analisadas processadas apresentou alteração estatisticamente significativa em seu valor de NNP em relação ao leite sem tratamento.

HUMBERT et al. (1980) foram os únicos a avaliar a variação de NNP em leite tratado por homogeneização a ultra alta pressão, em seu estudo nenhuma variação significativa em NNP foi encontrada para tratamentos de 200 MPa a 600 MPa.

Em tratamento do tipo isostático BUFFA et al. (2001) e GAUCHERON et al. (1997) não constataram nenhuma alteração no NNP. BUFFA et al. (2001) analisaram leite de cabra integral submetido a tratamento de 500 MPa por 15 minutos a 20°C, enquanto GAUCHERON et al. (1997) utilizaram leite de vaca desnatado tratado entre 250 e 600 MPa por 30 minutos.

O fato de não haver alteração no nível de NNP sugere que mesmo com as alterações na estrutura de caseína e proteínas do soro, estas modificações não têm intensidade suficiente para gerar proteólise intensa e liberação de nitrogênio das moléculas de proteína. Moléculas pequenas que têm pouca estrutura secundária, terciária e quaternária, como aminoácidos, vitaminas e componentes aromáticos permanecem inalterados (HUPPERTZ et al., 2002).

Ainda em tratamentos isostáticos, KIELCZEWSKA et al. (2004) constataram um aumento no valor de NNP+PPN (proteose peptona) em leites tratados em alta pressão isostática (200 MPa a 1000 MPa por 15 minutos). Este aumento ocorreu somente a partir de 400 MPa e aumenta com o incremento da pressão aplicada. Os autores sugerem que o fato está relacionado ao tratamento de alta pressão isostática alterar a composição das proteínas, atingindo algumas vezes, dependendo do nível do tratamento, até mesmo a estrutura secundária de algumas moléculas. Como foram aplicados níveis de no máximo 300 MPa, sugere-se que esta intensidade em homogeneização de alta pressão não seja suficiente para atingir este mesmo nível de desnaturação proteica.

A Figura 1.5 mostra a foto do sobrenadante e precipitado obtidos no processo de separação da caseína e proteínas do soro.

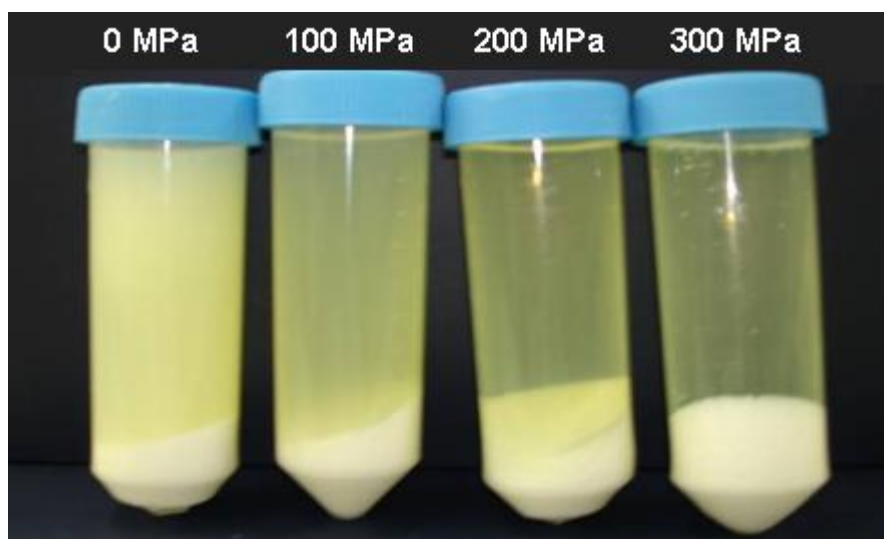


Figura 1.5: Sobrenadante e precipitado obtidos no processo de obtenção da caseína e proteínas do soro em leite processado por HUAP

Após a separação foi analisada a turbidez do soro obtido a partir de leite processado em diferentes níveis de HUAP. A Figura 1.6 apresenta os valores de turbidez obtidos. Os dados apresentados são provenientes de 3 processos distintos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

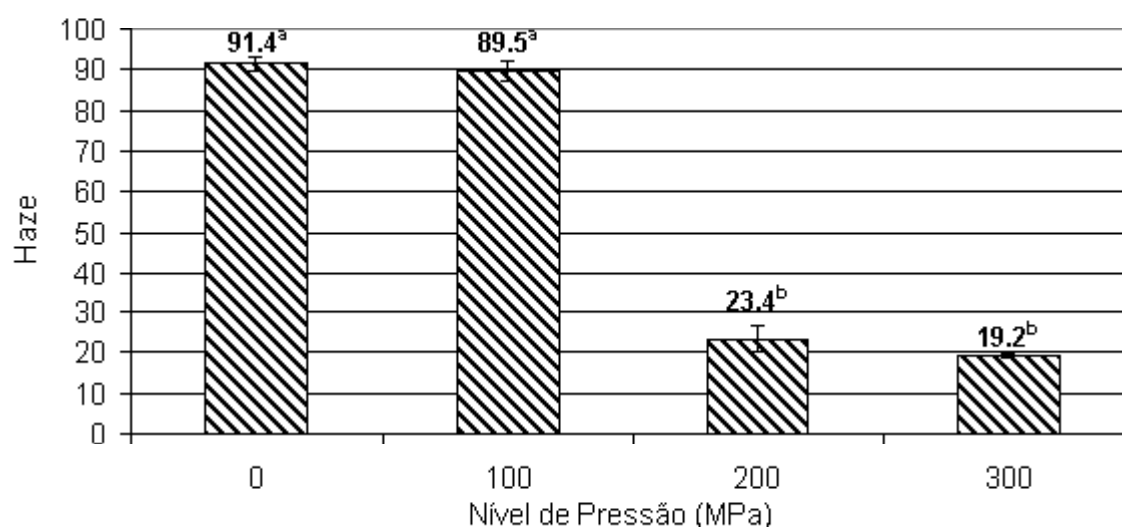


Figura 1.6: Turbidez (Haze) do soro obtido pela acidificação a pH 4.6 de leite processado por HUAP

* Média ± Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Vários autores relataram que as proteínas de soro desnaturadas por alta pressão tornam-se precipitáveis em pH 4.6 (NEEDS et al., 2000; LOPEZ-FANDINO & OLANO,

1998; FELIPE et al., 1997; LOPEZ-FANDINO et al., 1996). A análise de turbidez e a mudança visual notada no soro obtido de leite tratados em 200 MPa e 300 MPa, juntamente com os dados de NNC obtidos no presente estudo, tornam evidente o efeito do processo de HUAP na desnaturação de proteínas do soro.

3.7. Hidrofobicidade

A hidrofobicidade do leite está diretamente relacionada com a estrutura das micelas e exposição de grupos hidrofóbicos, que normalmente encontram-se na porção mais interna das micelas estabilizadas. Os efeitos do calor e da pressão resultam em modificações na conformação das micelas, incluindo a exposição de sítios hidrofóbicos anteriormente encobertos, que podem então interagir e gerar processos de agregação e, eventualmente, precipitação das proteínas (BONOMI et al., 1988).

Para determinação do valor de hidrofobicidade de uma amostra é preciso determinar a concentração ótima de reagente, neste caso um agente de fluorescência, para a solução a ser analisada. A Figura 1.7 apresenta a fluorescência de leite desnatado em diferentes concentrações do agente fluorescente utilizado (ANS).

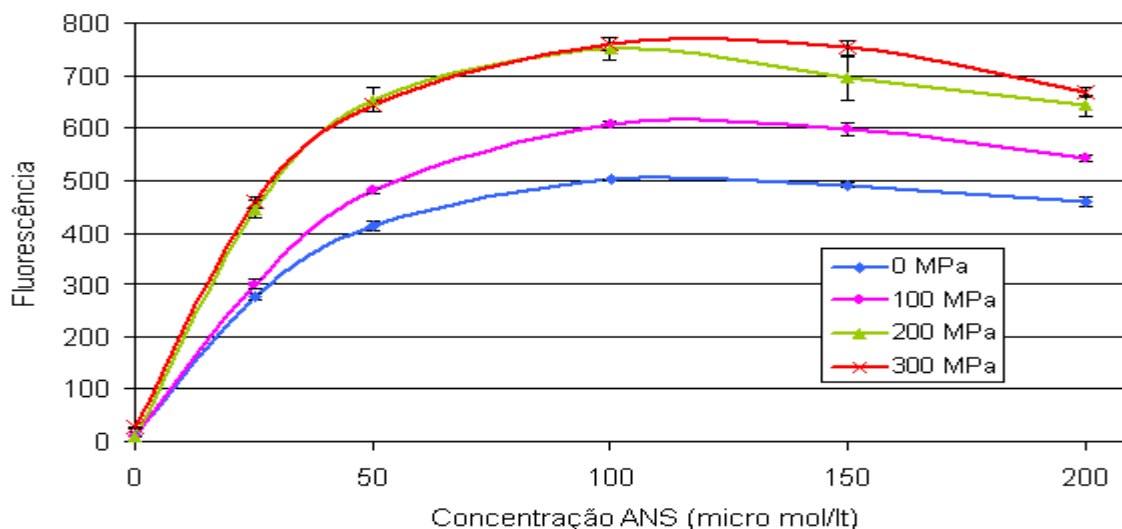


Figura 1.7: Fluorescência de leite processado em HUAP em diferentes concentrações de ANS em solução

* Média \pm Desvio Padrão, 9 medidas provenientes de 3 processamentos distintos.

As curvas obtidas demonstram a determinação da concentração ótima de reagente onde se obtém a fluorescência máxima do sistema. Em todas elas a fluorescência máxima (F_{\max}) ocorre na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$.

A Figura 1.8 apresenta as curvas de fluorescência obtidas com a utilização de ANS na concentração ótima de 100 $\mu\text{mol/L}$ e os diferentes níveis de HUAP aplicados.

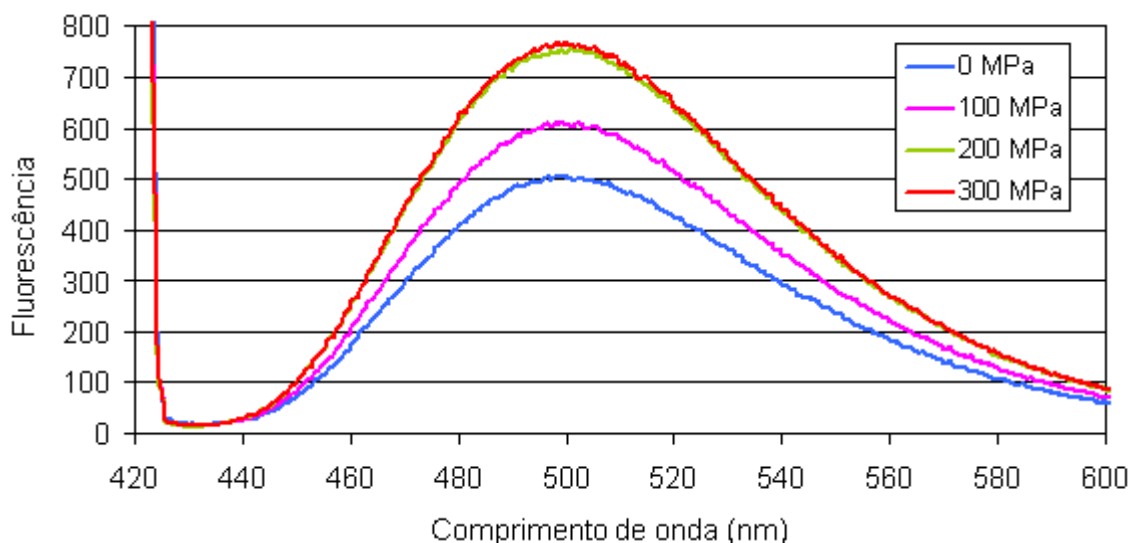


Figura 1.8: Fluorescência de leite processado em HUAP com concentração ótima de ANS (100 $\mu\text{mol/L}$)

* Média de 9 medidas provenientes de 3 processamentos distintos.

Os resultados demonstram um aumento progressivo da hidrofobicidade com o aumento da pressão aplicada especialmente até 200 MPa. Entre as pressões de 200 MPa e 300 MPa não existe diferença significativa no valor de fluorescência.

GUERZONI et al. (1999) constataram um aumento no volume das micelas de caseína de leite de cabra integral submetido a HUAP de 100 MPa; correlacionando os dados encontrados com dados obtidos com o uso de alta pressão isostática os autores sugeriram um possível aumento da hidrofobicidade também para o leite tratado por HUAP. BOUAOUINA et al. (2006) constataram aumento da hidrofobicidade a partir de 100 MPa, sendo o aumento gradativo até 300 MPa; porém utilizaram uma solução de β -lactoglobulina ao invés de leite.

Já em tratamento do tipo isostático, este aumento também foi notado por autores em leite e leite desnatado (JOHNSTON et al., 1992 e GAUCHERON et al., 1997). Nestes estudos, realizados em equipamento do tipo isostático, a variação foi dependente do nível de pressão, do tempo de tratamento e da temperatura em que a amostra foi mantida durante o tratamento; sempre a hidrofobicidade da amostra pressurizada foi superior ao padrão.

Segundo JOHNSTON et al. (1992), o aumento da hidrofobicidade é causado pela desnaturação irreversível de proteínas, a qual perdura por até 8 dias a 5°C. GAUCHERON et al. (1997) concluem que o tratamento isostático de alta pressão induz a uma desintegração irreversível da micela de caseína em partículas menores, um aumento na hidratação da micela de caseína e desnaturação da β -lactoglobulina em leite desnatado, resultando em um maior valor de hidrofobicidade.

O tratamento isostático de alta pressão (200 MPa a 1000 MPa) de solução de β -lactoglobulina causa um grau limitado e variável de mudanças estruturais e desnaturação parcial de β -lactoglobulina resultando num aumento da hidrofobicidade superficial, a qual poderia mediar a formação de agregados (PITTIA et al., 1996 e HAYAKAWA et al., 1996).

Para melhor visualizar a intensidade do efeito do tratamento, a Figura 1.9 apresenta a variação percentual do valor de F_{\max} em relação ao leite sem tratamento, obtida para cada nível de pressão.

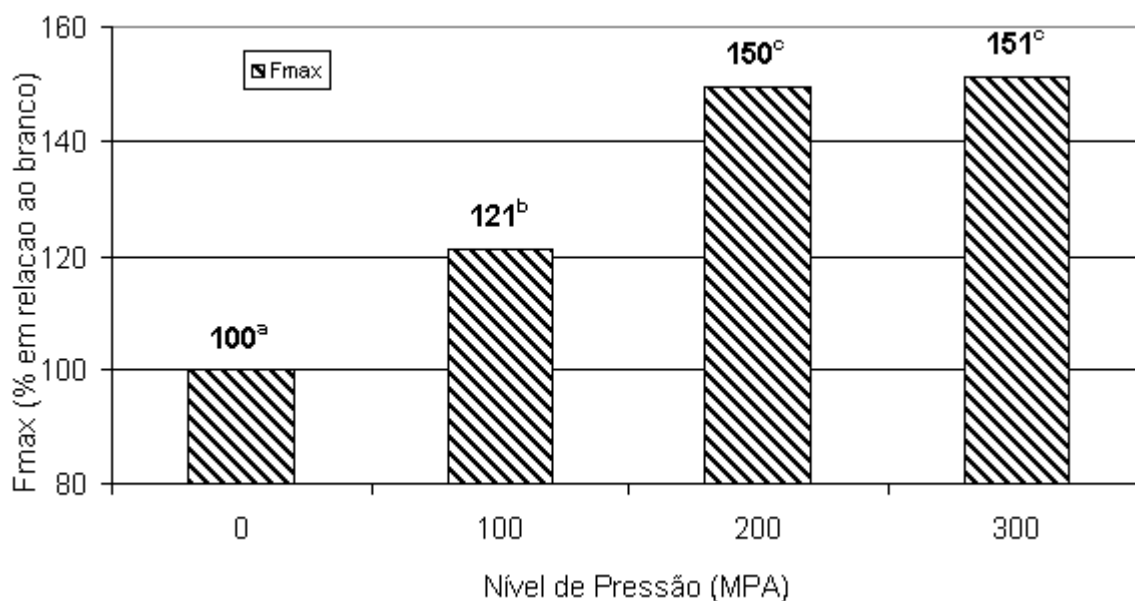


Figura 1.9: Fluorescência máxima (Fmax) de leite processado como percentual relativo ao leite sem processamento

* Média de 9 medidas provenientes de 3 processamentos distintos, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

O nível de 100 MPa causa aumento estatisticamente significativo em relação ao padrão, enquanto 200 MPa e 300 MPa apresentam aumento estatisticamente significativo em relação ao nível 100 MPa, mas não entre si. Este fato deve estar relacionado com a

extensão do nível de desnaturação possível de ocorrer, sendo 200 MPa suficiente para causar os efeitos de exposição máxima de sítios hidrofóbicos.

Portanto, o aumento da hidrofobicidade demonstrado no presente estudo pode estar relacionado a desnaturação de proteínas do soro, principalmente β -lactoglobulina, e também com a dissociação de micelas de caseína, sobretudo considerando-se os resultados obtidos no item 3.6 do presente estudo.

3.8. Viscosidade

A viscosidade é um parâmetro que pode ser modificado pela alteração da capacidade das proteínas em ligar-se a um maior número de moléculas de água. Vários tipos de polímeros são utilizados para aumentar a viscosidade de soluções para obter diferentes efeitos tecnológicos e sensoriais. GAUCHERON et al. (1997) relataram um aumento na capacidade de retenção de água de proteínas de leite submetido a homogeneização de alta pressão, mas não avaliaram se este aumento causa alterações também na viscosidade do leite.

A Figura 1.10 apresenta viscosidade de 3 processos distintos de leite homogeneizado em diferentes níveis de pressão.

Ocorreu aumento significativo ($p < 0.05$) para o leite tratado a 300 MPa.

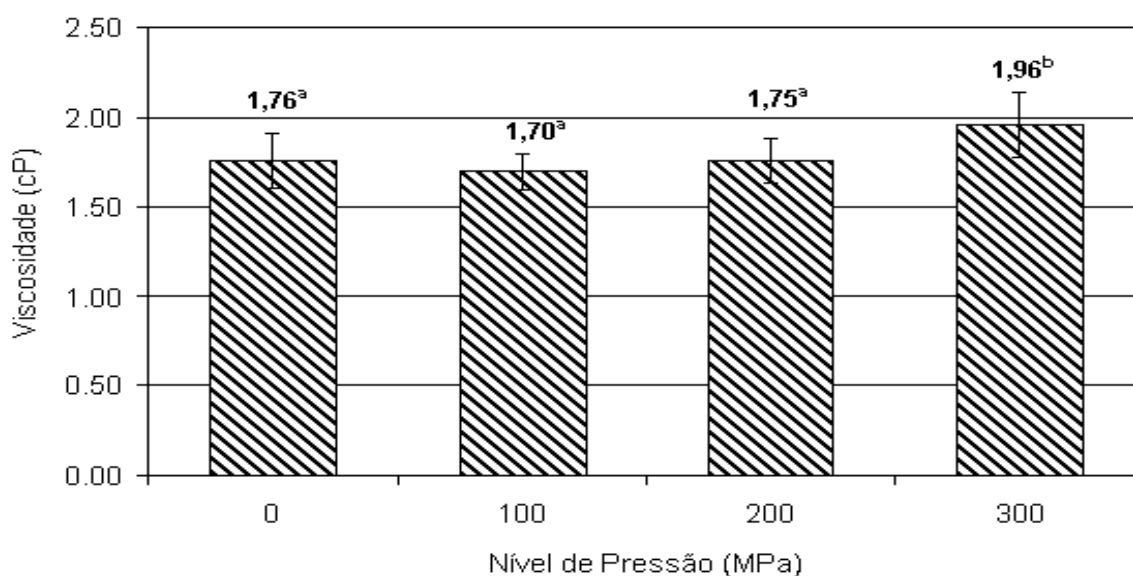


Figura 1.10: Viscosidade de leite processado em diferentes níveis de HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

KIELCZEWSKA et al. (2003) relatam aumento progressivo da viscosidade com o aumento da pressão aplicada em leite homogeneizado entre 20 MPa e 140 MPa. Os autores associam este aumento a maior dispersão dos glóbulos de gordura e subsequente adsorção de proteínas a estes glóbulos.

Anteriormente SHIBAUCHI et al. (1992), DESOBRY-BANON et al. (1994) e HARTE et al. (2003) já haviam descrito o aumento da viscosidade dinâmica de leite desnatado, fluido e reconstituído, respectivamente, submetido a tratamento de alta pressão em equipamento isostático. Todos demonstraram que pressões de 300 MPa ou superiores, aumentavam a viscosidade de leite de valores iniciais de aproximadamente 1,5 a 1,6 cP para aproximadamente 1,8 cP, após o tratamento.

MUSSA & RAMASWAMY (1997) notaram incremento progressivo de viscosidade somente a partir de 250 MPa até 400 MPa para um mesmo tempo de tratamento isostático de alta pressão. Importante ressaltar que estes autores notaram o incremento em leite integral, motivo pelo qual os valores encontrados foram superiores (2.00 cP a 2.14 cP).

No presente estudo somente o leite tratado em nível de pressão de 300 MPa apresentou aumento de viscosidade estatisticamente significativo. O aumento de viscosidade a partir deste nível pode estar relacionado com a desnaturação de proteínas de soro, pelo efeito de desintegração de parte das micelas de caseína que passam para a fração aquosa do leite e pela maior hidratação das moléculas de proteína após o tratamento. Este fator pode ser interessante sobretudo para leite desnatado, como forma de recuperar o *mouthfeel* perdido pela retirada da gordura.

4. Conclusões

O processamento de homogeneização de ultra alta pressão é um tratamento viável e consistente para leite desnatado. O processo causa um aumento da temperatura do leite equivalente a $0,177^{\circ}\text{C}$ para cada 1 MPa aplicado.

O leite submetido a este tipo de tratamento apresenta algumas alterações físico-químicas, sobretudo no que tange à estrutura proteica, que podem gerar benefícios tecnológicos funcionais de interesse. Por outro lado, não causa alterações na composição centesimal do leite e nem proteólise intensa capaz de aumentar a quantidade de nitrogênio não proteico.

A maior parte das alterações é dependente do nível do tratamento. Quanto maior o nível de tratamento maior o efeito na estrutura das micelas de caseína e proteínas do soro. Nem todas as alterações são equivalentes qualitativa e quantitativamente a tratamento de alta pressão em sistema isostático.

O tratamento de HUAP entre os níveis de 0 e 300 MPa não causa alteração no pH do leite e este comportamento persiste por pelo menos 48 horas após o tratamento.

Alteração na viscosidade do leite tratado somente ocorre a partir de 300 MPa, sendo o aumento da ordem de 10%.

Quanto a estabilidade a precipitação por álcool, o leite submetido a tratamento de homogeneização a alta pressão apresentou estabilidade igual ou maior que leite sem tratamento, permitindo seu uso em processos combiandos de pressão e temperatura.

Tratamentos entre 100 MPa e 200 MPa causam um ligeiro aumento na luminosidade, porém a partir de 300 MPa ocorre um decréscimo no valor observado e a luminosidade do leite volta ao nível inicial do leite não tratado.

Os dados de hidrofobicidade mostram um aumento intenso e progressivo até o nível de 200 MPa, entre 200 MPa e 300 MPa o aumento passa a ser muito pequeno e não difere estatisticamente do nível inferior.

Finalmente, quando se avaliou a desnaturação de proteínas de soro através de quantificação de NNC e NNP, concluiu-se que 200 MPa e 300 MPa são níveis de pressão suficientes para promover a desnaturação de proteínas do soro e causar a passagem para a fração insolúvel em pH 4.6. Mais uma vez, quanto maior o tratamento maior a desnaturação.

5. Referências Bibliográficas

- ANEMA, S. G.; MCKENNA, A. B. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, p.422-428, 1996.
- ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. International Dairy Congress, 15; London, 1959.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. 13rd.ed. Washington, D. C., 1980.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. 16th.ed. Gaithersburg, 1997.
- BIKKER, J. F.; ANEMA, S. G.; LI, Y.; HILL, J. P. Thermal denaturation of β -lactoglobulin in heated skim milk. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 11, p. 609-613, 2000.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BONOMI, F.; IAMETTI, S.; PAGLIARINI, E.; PERI, C. A spectrofluorimetric approach to the estimation of the surface hydrophobicity modifications in milk proteins upon thermal treatment. **Milchwissenschaft**, v. 43, n. 5, p. 281-285, 1988.
- BOUAOUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v.16, p. 275-284, 2006.
- BUFFA, M.; TRUJILLO, A. J., GUAMIS, B. Rennet coagulation properties of raw, pasteurised and high pressure-treated goat milk. **Milchwissenschaft**, v. 56, n. 5, p. 243-246, 2001.
- CAMPOS, F. P.; DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. The use of high-pressure technology in food processing. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 351-357, 2002.
- DATTA, N.; HAYES, M. G.; DEETH, H. C.; KELLY, A. L. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 393-399, 2005.

- DE LA FUENTE, M. A.; OLANO, A.; CASAL, V.; JUAREZ, M.; Effects of high pressure and heat treatment on the mineral balance of goat's milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 65-72, 1999.
- DESOBRY-BANON, S.; RICHARD, F.; HARDY, J. Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 3267-3274, 1994.
- FELIPE, X.; CAPELLAS, M.; LAW, A. J. R. Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurisation on the whey proteins in goat's milk. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 627-631, 1997.
- FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LEGRAND, J. Effect of ultra high pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein stabilized emulsions. **Journal of Food Science**, v.67, n. 9, p.3388–3395, 2002.
- FOX, P. F. & McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: FOX, P. F. **Dairy chemistry and Biochemistry**. (Ed). London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 147-238.
- GAUCHERON, F.; FAMELART, M. H.; MARIETTE, F.; RAULOT, K.; MICHEL, F.; LE GRAET, Y. Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 439-447, 1997.
- GOMES, F. P. Curso de Estatística Experimental. 10 ed, São Paulo: Nobel. 430p. 1982.
- GUERZONI, M. E.; VANININI, L.; CHAVES LOPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GIANOTTI, A. Effect of high pressure homogenisation on microbial and physico-chemical characteristics of goat cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 851-862, 1999.
- HARTE, F.; LUEDECKE, L.; SWANSON, B.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Low fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. **Journal of Dairy Science**, v.86, p. 1074–1082, 2003.
- HAYAKAWA, I.; LINKO, Y.; LINKO, P. Mechanism of High Pressure Denaturation of Proteins. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 29, n. 8, p. 756-762, 1996.
- HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy research**, V.70, p.297-305, 2003.

- HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. **Journal of Dairy research**, V.72, p.25-33, 2005.
- HEWEDI, M. M.; MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. Recovery of milk protein by ethanol precipitation. **Irish Journal of Food Science and Technology**, v.9, p. 11-23, 1985
- HUMBERT, G.; DRIOU, A.; GUERIN, J.; ALAIS, C. Effets de l'homogénéisation à haute pression sur les propriétés du lait et son aptitude à la coagulation enzymatique. **Le lait**, v. 60, p. 574-594, 1980.
- HUPPERTZ, T.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Effects of high pressure on constituents and properties of milk. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 561-572, 2002.
- HUPPERTZ, T.; GROSMAN, S.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Heat and ethanol stabilities of high pressure treated bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 125-133, 2004.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Properties of casein micelles in high pressure treated bovine milk. **Food Chemistry**, v. 87, p. 103-110, 2004b.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KRUIF, K. G.; KELLY, A. L. High pressure induced changes in bovine milk proteins: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 593-598, 2006.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Determination of the casein content of milk**. IDF Standard nº29, IDF, Brussels, Belgium, 1964.
- JOHNSTON, D. E.; AUSTIN, B. A.; MURPHY, R. J. Effects of high hydrostatic pressure on milk. **Milchwissenschaft**, v. 47, n. 12, p. 760-763, 1992.
- JOHNSTON, D. E.; RUTHERFORD, J. A.; MCCREDY, R. W. Ethanol stability and chymosin induced coagulation behaviour of high pressure treated milk. **Milchwissenschaft**, v.57, n.7, p. 363-366, 2002.
- KESSLER, H. G.; BEYER, H. J. Thermal denaturation of whey protein and its effect in dairy technology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 3, p. 165-173, 1991.
- KIELCZEWSKA, K.; KRUK, A.; CZERNIEWICZ, M.; WARMINSKA, M.; HAPONIUK, E. The effect of high pressure homogenization on changes in milk colloidal and emulsifying systems. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.12, p.43-46, 2003.

- KIELCZEWSKA, K.; CZERNIEWICZ, M.; MICHALAK, J.; BRANDT, W. The effect of high pressure on nitrogen compounds of milk. **Journal of Physics: Condensed matter**, v.16, p.1067-1070, 2004.
- LAW, A. J. R.; LEAVER, J.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; PLA, R.; GUAMIS, B. Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 2523-2530, 1998.
- LOPEZ-FANDINO, R; CARRASCOSA, A. V.; OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese making properties of raw milk. **Journal of Dairy Science** v.79, p.924-936, 1996.
- LOPEZ-FANDINO, R.; RAMOS, R.; OLANO, A. Rennet coagulation of milk subjected to high pressures. **J. Agric. Food Chem.** v.45, p.3233-3237, 1997.
- LOPEZ-FANDINO, R. & OLANO, A. Effects of high pressures combined with moderate temperatures on the rennet coagulation properties of milk. **International dairy journal** v.8, p. 623-627, 1998.
- LOPEZ-FANDINO, R.; DE LA FUENTE, M. A.; RAMOS, M.; OLANO, A. Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurized milks from different species. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p.69-78, 1998.
- LOPEZ-FANDINO, R. High pressure induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. **International Dairy Journal**, v. 16, p.1119-1131, 2006.
- MUSSA, D. M.; RAMASWAMY, H. S. Ultra high pressure pasteurisation of milk : kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 30, n. 6, p. 551-557, 1997.
- NEEDS, E. C.; STENNING, R. A.; GILL, A. L.; FERRAGUT, V.; RICH, G. T. High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n.1, p. 31-42, 2000.
- NEEDS, E. C.; CAPELLAS, M.; BLAND, A. P.; MANOJ, P.; MACDOUGAL, D.; PAUL, G. Comparison of heat and pressure treatments of skim milk, fortified with whey protein concentrate, for set yoghurt preparation: effects on milk proteins and gel structure. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 329-348, 2000b.
- ORLIEN, V.; KNUDSEN, J. C.; COLON, M.; SKIBSTED, L.H. Dynamics of casein micelles in skim milk during and after high pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 98, p. 513-521, 2006.

- PAQUIN, P. Technological properties of high pressure homogenisers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 329-335, 1999.
- PITTIA, P.; WILDE, P. J.; HUSBAND, F. A.; CLARK, C. C. Functional and structural properties of β -lactoglobulin as affected by high pressure treatment. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1123-1128, 1996.
- REGNAULT, S.; THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: effects on casein micelle size distribution. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 55-68, 2004.
- SANDRA, S. & DALGLEISH, D. G. Effects of ultra high pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, v.15, p.1095-1104, 2005.
- SCOLLARD, P. G.; BERESFORD, T. P.; NEEDS, E. C.; MURPHY, P. M.; KELLY, A. L. Plasmin activity, β -lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk. **International Dairy Journal** v.10, p.835-841, 2000.
- SHIBAUCHI, Y.; YAMAMOTO, H.; SAGARA, Y. Conformational change of casein micelles by high-pressure treatment. In: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P. (Ed.). **High Pressure Biotechnology**. London: John Libbey Eurotext, 1992. V. 224, p. 239-242.
- SUBIRADE, M.; LOUPIL, F.; ALLAIN, A. F.; PAQUIN, P. Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of β -lactoglobulin and on its conformational properties as determined by fourier transform infrared spectroscopy. **International Dairy Journal**, v.8, p.135-140, 1998.
- TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; BUFFA, M.; ROYO, C.; GERVILLA, R.; FELIPE, X.; SENDRA, E.; SALDO, J.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Application of high pressure treatment for cheese production. **Food Research International**, v.33, p.311-316, 2000.
- TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; SALDO, J.; GERVILLA, R.; GUAMIS, B. Applications of high hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.3, p. 295-307, 2002.
- ZOBRIST, M. R.; HUPPERTZ, T.; UNIACKE, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. High pressure induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p.655-662, 2005

CAPÍTULO 2 – Propriedades Funcionais de Caseína Obtida a Partir de Leite Processado por Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP).

Resumo

As propriedades funcionais da caseína têm sido largamente utilizadas na indústria de alimentos. O uso da alta pressão em equipamentos do tipo isostático e de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) tem sido considerado uma ótima alternativa para alterar ou otimizar as propriedades de superfície de proteínas. Neste estudo avaliou-se algumas propriedades funcionais de caseína obtida de leite desnatado previamente submetido a tratamento de HUAP em diferentes níveis (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa). A caseína foi isolada por acidificação a pH 4,6 e centrifugação; o precipitado obtido foi então dissolvido e neutralizado até pH 6,7 e finalmente liofilizado para uso. Foram avaliadas as seguintes propriedades: solubilidade, capacidade de formação de espuma, estabilidade de espuma, capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão. A única propriedade a não sofrer alteração em nenhum dos níveis de tratamento foi a solubilidade, e este resultado foi válido para os três níveis de pH avaliados (3,5 – 5,0 – 6,5). A caseína obtida do leite tratado a 300 MPa foi a que apresentou os maiores valores em todos os parâmetros, com exceção da capacidade de formação de espuma. Os produtos obtidos de leite tratado nos níveis de 100 MPa e 200 MPa apresentaram maior capacidade emulsificante que o produto obtido de leite sem tratamento. Foi avaliado também o índice de atividade emulsificante dos produtos. Esta propriedade não apresentou correlação com os resultados de capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão. A melhora de performance dos produtos obtidos de leite processado em HUAP pode estar relacionada à alteração de parte das micelas de caseína permitindo que as mesmas tenham maior elasticidade e formem filmes mais espessos na interface.

Summary

The functional properties of casein have been extensively used at the food industry. Among the options, the high pressure treatments using, either the high hydrostatic pressure either the ultra high pressure homogenization (UHPH), has been considered an excellent alternative to modify or to optimize the superficial properties of proteins. At this study we have evaluated some functional properties of caseins obtained from raw skimmed milk previously treated by UHPH at different pressure levels (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa). The casein has been isolated by acidification at pH 4,6 and centrifugation, further it has been diluted, neutralized to pH 6,7 and finally freeze-dried. The following properties have been evaluated: solubility, foaming capacity, foam stability, emulsifying capacity and emulsion stability. The only properties that have not shown any improvement were solubility, and this behavior was valid for the three evaluated pH levels (3,5 – 5,0 – 6,5). The casein obtained from the milk homogenized at 300 MPa presented the higher results for all evaluations, with exception of foaming capacity. The freeze-dried casein obtained from the milk homogenized at 100 MPa and 200 MPa showed higher emulsifying capacity than products obtained from milk with no homogenization. The emulsifying activity index (EAI) has also been evaluated; it presented no correlation with emulsifying capacity and emulsion stability. The best performance from the freeze-dried caseins obtained from homogenized milk might be related with some modification on casein micelles allowing them to be more flexible and to form thicker films at the interface.

1. Introdução

Proteínas de várias fontes têm sido investigadas como proteínas funcionais. O leite é fonte de pelo menos 7 proteínas funcionais com propriedades significativamente diferentes: caseína ácida, caseína enzimática, caseinatos, co-precipitados de caseína e proteínas do soro, concentrados e isolados de proteínas do soro e lactoalbumina. (MULVIHILL & FOX, 1983). A caseína comercial produzida através de precipitação ácida ou com uso do coalho, é uma das principais proteínas funcionais alimentares; apresenta propriedades que não podem ser substituídas por outras proteínas em certas aplicações, e vem sendo produzidas há cerca de 70 anos (FOX, 1989).

A caseína é largamente utilizada na indústria como uma proteína com características superficiais ativas e funcionais (MOHANTY et al., 1988). Além disso, segundo MULVIHILL & FOX (1983), qualquer condição de processo que cause desnaturação proteica pode também influenciar as características da espuma.

O termo “propriedade funcional” da proteína, em relação aos alimentos, refere-se às propriedades físico-químicas das proteínas que afetam as características dos alimentos, como a textura, cor, flavor, absorção/ligação de água e estabilidade. Algumas das mais importantes propriedades físico-químicas são a solubilidade, hidratação, atividade de superfície e geleificação (FOX & MCSWEENEY, 1998).

Algumas propriedades funcionais dependem de mais de uma característica: a geleificação, a viscosidade e a solubilidade dependem da interação proteína-proteína, e da interação proteína-água (DAMODARAM, 1993 APUD ROMAN, 2002).

Segundo SGARBIERI (1996), a solubilidade é uma propriedade físico-química fundamental das proteínas e relaciona-se diretamente com a funcionalidade das proteínas no alimento. A solubilidade das proteínas é afetada pelo pH, força iônica, temperatura, polaridade do solvente, condições do processamento, método de isolamento, interações com outros componentes do alimento e tratamentos mecânicos. Estes agentes afetam a solubilidade das proteínas principalmente causando alterações nas interações hidrofílicas e hidrofóbicas da superfície da proteína.

As propriedades de superfície dependem da formação de películas bipolares na interface entre duas fases imiscíveis, como as propriedades emulsificantes e espumantes. Devido às suas características de afinidade (polaridade – apolaridade) as proteínas são capazes de se concentrar nas interfaces, baixar a tensão superficial entre óleo-água e água-ar, formando emulsões ou espumas, respectivamente (HILL, 1998). A emulsificação

e aeração dependem da solubilidade, hidrofobicidade, e do tamanho molecular (DAMODARAM, 1993 APUD ROMAN, 2002).

Tratamentos de alta pressão influenciam especificamente as propriedades físico-químicas e funcionais de proteínas através da ruptura e recuperação de pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas e iônicas. Estas alterações dependem da estrutura da proteína, do nível de pressão, da temperatura, pH, força iônica e concentração da proteína (LOPEZ-FANDINO, 2006). As mudanças induzidas pelo tratamento de alta pressão tendem a, em geral, aumentar a área acessível ao solvente, e conseqüentemente melhorar as propriedades de superfície da proteína e também sua funcionalidade dentro do sistema (PITTIA et al., 1996).

Em leite de vaca tratado em alta pressão isostática entre 100 MPa e 400 MPa, a dissociação das micelas de caseína ocorre na seguinte ordem: $\beta > \kappa > \alpha s1 > \alpha s2$. (LOPEZ-FANDINO et al., 1998).

Mais recentemente a tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) tem sido desenvolvida como alternativa tanto ao tratamento térmico como ao processo isostático de alta pressão. A HUAP tem sido proposta como alternativa efetiva para a pasteurização de leite e provavelmente compartilha alguns mecanismos de ação com o tratamento isostático. Todavia a dinâmica do processo das duas tecnologias não é similar (GUERZONI et al., 1999). Portanto, é possível que também as alterações na estrutura das proteínas ocorra de maneira diferenciada, resultando em alterações e efeitos também diferenciados.

O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito de diferentes níveis de HUAP em leite desnatado para alterar as seguintes propriedades funcionais da caseína: solubilidade, aeração e emulsificação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Matéria-prima

Foi utilizado leite cru desnatado (0,5% MG) obtido na Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas, Jaguariúna, SP. O leite foi recolhido na manhã do mesmo dia de cada processamento e mantido em estocagem refrigerada (8°C) até o momento de sua utilização.

2.2. Processamento do Leite

O leite foi processado em equipamento de homogeneização contínuo do tipo homogeneizador de Ultra Alta Pressão, modelo nG7400H:350 fabricado por Stansted Fluid Power Ltda., Essex, Inglaterra. As condições de processo e procedimentos de trabalho foram iguais aos descritos no Capítulo 1 deste estudo.

Cada processo foi monitorado com termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer, posicionados em 4 pontos : entrada do produto, entrada da válvula de homogeneização, saída da válvula de homogeneização e saída do trocador de calor.

Ao fim de cada processo o equipamento foi higienizado pelo enxágüe com água, seguido de soda 2,5%, novamente enxaguado com água, e finalmente preenchido com álcool 70% (v/v), que foi mantido durante pelo menos 24 horas dentro do equipamento.

Foi realizada triplicata de processo em cada nível de pressão avaliado.

2.3. Obtenção da caseína

A extração da caseína consistiu em misturar quantidades definidas de leite, água, ácido acético e acetato em condições controladas de temperatura promovendo a precipitação de parte das proteínas do leite, conforme descrito pela metodologia IDF no 29 (1964).

A mistura foi então centrifugada a temperatura ambiente a 4500 rpm por 15 minutos (Figura 2.1), em centrífuga refrigerada FANEM modelo FR22, e o sobrenadante filtrado em papel Whatman no 49, conforme LOPEZ-FANDINO et al. (1996).

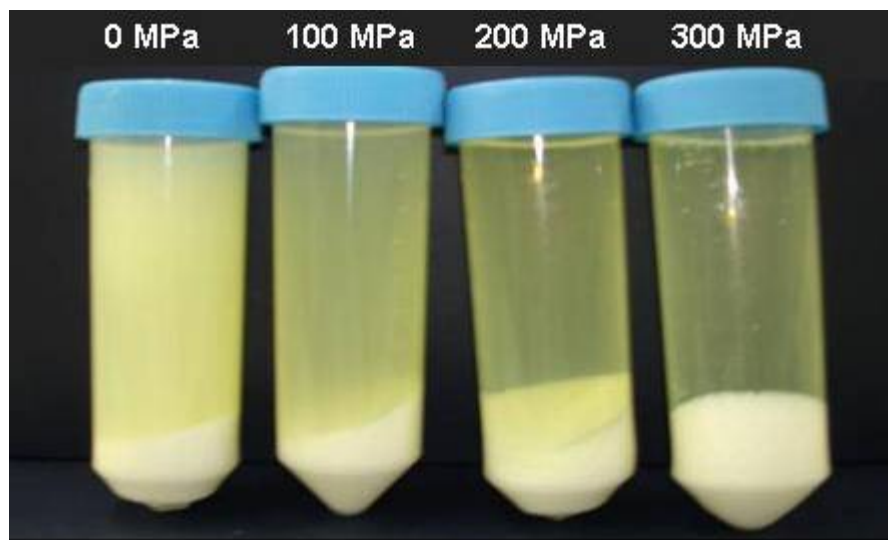


Figura 2.1: Sobrenadante e precipitado obtidos no processo de obtenção da caseína

2.4. Liofilização

O precipitado obtido pelo processo descrito no item anterior (2.3) foi pesado e suspenso em água destilada em quantidade equivalente a 2 vezes o peso de precipitado. Esta solução foi mantida sob agitação em agitador magnético e neutralizada a pH 6.6 com adição de solução de NaOH 6M e 1M.

As soluções de caseína foram liofilizadas á vácuo (0,06 atm) em liofilizador EDWARDS modelo Super Modulyo em temperatura de -40°C por período de 48 horas. Retiradas do liofilizador foram homogeneizadas em triturador de hélice (liquidificador).

As amostras de caseína liofilizada de 3 processamentos distintos, realizados com matérias-primas distintas, foram misturadas, homogeneizadas e mantidas sob refrigeração de 8 a 10°C até o momento de sua utilização nos testes de funcionalidade.

2.5. Determinação da composição centesimal de caseína liofilizada

As caseínas liofilizadas obtidas dos leites submetidos a cada nível de tratamento de alta pressão foram analisadas em triplicata para determinação de sua composição centesimal. A quantificação de umidade, resíduo mineral (cinzas) e nitrogênio total foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no A.O.A.C. (1980). Os lipídios totais foram determinados pelo método descrito por BLIGH & DYER (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (na proporção 10:20:8, respectivamente) para

extração dos lipídios. Os carboidratos foram determinados por diferença, subtraindo de 100% a soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

2.6. Solubilidade

A solubilidade proteica (SP) foi determinada de acordo com o método de MORR et al. (1985), que consiste em uma modificação do método de determinação do índice de nitrogênio solúvel. Foi estudado o efeito da variação de pH, nos níveis de 3,5, 5,0 e 6,5, sobre a solubilidade dos extratos.

Para cada amostra foi pesado 500 mg de proteína em béquer de 50 mL. Foram adicionadas alíquotas de NaCl 0,1M com agitação manual até a formação de uma pasta, em seguida foi adicionado mais NaCl 0,1M até o volume de 40 mL e agitado em agitador magnético. O pH da solução foi ajustado ao nível desejado, 3,5, 5,0 ou 6,5, com solução de HCl ou NaOH 0,1N. A dispersão foi mantida sob agitação por 1 hora e o pH monitorado e mantido no nível desejado. A amostra foi então transferida para um balão volumétrico de 50 mL e diluída até a marca com mais solução de NaCl 0,1M.

A solução foi centrifugada por 30 minutos a 5500 rpm em centrífuga FANEM modelo FR22 e a quantidade de proteína solúvel do sobrenadante determinada pelo método de micro-Kjeldahl, considerando o fator de multiplicação de 6.38 (A.O.A.C. 1980). A solubilidade de proteína calculada pela fórmula:

$$SP (\%) = \frac{\text{concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL)} \times 50}{\text{peso da amostra (mg)} \times \text{conteúdo de proteína da amostra (\%)}} \times 100$$

Cada amostra foi analisada em triplicata, e cada uma delas em triplicata de % de proteína.

2.7. Aeração

As avaliações de aeração foram realizadas considerando dois fatores:

2.7.1. Capacidade de Formação de Espuma

O método de avaliação utilizado foi descrito por PHILLIPS et al. (1990) e a capacidade de formação de espuma calculada segundo MOHANTY et al. (1988), pela fórmula descrita abaixo:

$$\text{CFE (\%)} = \frac{\text{Volume de espuma em tempo 0 minutos (mL)}}{\text{Volume original da solução de proteína (mL)}} \times 100$$

À partir das amostras de caseína liofilizada foram preparados 150 mL de solução 2,5% de proteína conforme metodologia de solubilização descrita por MORR et al. (1985). A solução teve seu pH ajustado a 7.0 com solução NaOH 0,1N.

Alíquotas de 50 mL da solução foram transferidas para um recipiente plástico apropriado mantido em banho de água para evitar o aumento da temperatura da solução e eventual perda de água por evaporação. A alíquota foi submetida a agitação de 10.000 rpm em Ultra-Turrax modelo T45-S5 da IKA-WERK por 15 minutos e a espuma formada foi transferida rapidamente para proveta graduada de 150 mL. O volume inicial de espuma foi medido e anotado.

Cada amostra foi analisada em quintuplicata.

2.7.2. Estabilidade da Espuma

A espuma foi deixada na proveta por 30 minutos. O volume da coluna de espuma e o volume da coluna de líquido foram anotados no transcorrer do tempo em 0,1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, para acompanhar a cinética de deterioração da mesma e avaliar a diferença entre as amostras.

A estabilidade da espuma foi avaliada também pela redução percentual do seu volume após 30 minutos em relação ao seu volume inicial, conforme descrito por PATEL et al. (1988). Cada amostra foi analisada em quintuplicata.

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Volume de espuma após 30 minutos}}{\text{Volume inicial da espuma (Vo)}} \times 100$$

2.8. Emulsificação

As avaliações de aeração foram realizadas considerando 3 fatores :

2.8.1. Capacidade Emulsificante

A capacidade emulsificante de uma proteína é definida como a quantidade máxima de óleo que pode ser dispersa em fase aquosa para um dado procedimento experimental. A metodologia utilizada foi baseada no procedimento proposto por DE KANTEREWICZ et al. (1987), e por MOHANTY et al. (1988).

A partir das amostras de caseína liofilizada foram preparados 200 mL de solução 0,5% de proteína conforme metodologia de solubilização descrita por MORR et al. (1985). Alíquotas de 25 mL da solução foram transferidas para béquer plástico de 400 mL e misturadas com 25 mL de óleo de soja comercial, adicionado de corante Sudan III na proporção de 40 mg/L.

A mistura foi submetida a agitação em agitador de hélice Tecnal modelo TE-039, com velocidade inicial baixa (1000 rpm) durante 1 minuto, para formar a emulsão. A velocidade foi aumentada para 3200 rpm e iniciou-se a adição de mais óleo de soja por gotejamento, taxa aproximada de 0,1 mL/s, até o momento de quebra da emulsão, facilmente identificado por uma perda repentina de viscosidade.

A capacidade de emulsão (CE) foi expressa pela quantidade de óleo (mL) adicionado até o ponto de colapso da emulsão. Cada amostra, proveniente da mistura de acseína de 3 processos de alta pressão distintos, foi analisada em quintuplicata.

2.8.2. Estabilidade da emulsão

A metodologia utilizada foi baseada no procedimento proposto por ACTON & SAFFLE (1970) e MCELWAIN et al. (1975). A partir das amostras de caseína liofilizada foram preparados 200 mL de solução 0,5% de proteína conforme metodologia de solubilização descrita por MORR et al. (1985). Alíquotas de 60 mL da solução foram transferidas para recipiente plástico adequado e misturadas com 20 mL de óleo de soja comercial. A mistura foi submetida a agitação de 10.000 rpm em Ultra-Turrax modelo T45-S5 da IKA-WERK por 1 minuto.

A umidade da emulsão recém preparada (U_0) e a umidade da emulsão mantida em estufa a 37°C após 2 horas (U_{2h}), foram determinadas segundo procedimento da A.O.A.C. (1980). A amostra de emulsão após 2 horas foi obtida retirando 5 mL da amostra do fundo do tubo de ensaio que continha 50 mL da emulsão.

Cada amostra foi analisada em triplicata e a estabilidade da emulsão (EEm) foi calculada pela fórmula:

$$EEm (\%) = \frac{100 - U_{2h}}{100 - U_0} \times 100$$

2.8.3. Índice de atividade emulsificante

A metodologia utilizada foi realizada conforme procedimento proposto por PEARCE & KINSELLA (1978).

A partir das amostras de caseína liofilizada foram preparados 200 mL de solução 0,5% de proteína conforme metodologia de solubilização descrita por MORR et al. (1985). Alíquotas de 60 mL da solução foram transferidas para recipiente plástico adequado e misturadas com 20 mL de óleo de soja comercial. A mistura foi submetida a agitação de 10.000 rpm em Ultra-Turrax modelo T45-S5 da IKA-WERK por 1 minuto.

Ao fim do processo, 1 mL da emulsão foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e diluído até a marca com uma solução de SDS a 0,1%. A partir da nova solução foi pipetado 1 mL em tubo de ensaio contendo 4 mL da solução SDS 0,1%. A amostra de emulsão diluída no fator 1:500 foi utilizada para realizar as leituras de absorbância, feitas em espectrofotômetro MiltonRoy modelo Spectronic 21D, em cubeta de 1 cm de diâmetro e em comprimento de onda de 500 nm.

Cada amostra foi analisada em triplicata de análise (leitura no espectrofotômetro), e o processo de emulsificação realizado também em triplicata.

O índice de atividade emulsificante foi calculado pela fórmula:

$$IAE (m^2/gr) = \frac{2 \times 2.303 \times \text{absorbância} \times \text{fator de diluição da emulsão}}{\Phi \times C \times 10000}$$

Onde Φ = fração volumétrica do óleo, C = concentração de proteína na fase aquosa antes da emulsão e 10000 = fator de correção para metros quadrados.

Para o cálculo de Φ foi necessário monitorar a densidade do óleo, a densidade da solução proteica, a concentração de solutos na solução proteica e a concentração de sólidos na emulsão.

2.9. Tratamento de dados

Todos os resultados encontrados no estudo foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as possíveis diferenças entre médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (GOMES, 1982), utilizando-se o programa "Statística: Basic Statistics and Tables".

3. Resultados e Discussão

3.1. Processamento do Leite

O leite utilizado para a obtenção da caseína foi o mesmo utilizado para as determinações feitas durante o item 3.1 do Capítulo 1 deste trabalho. Ou seja, as condições de processo e os resultados obtidos foram discutidos anteriormente.

O papel do aquecimento na desnaturação proteica também foi discutido no item 3.6 do Capítulo 1 e foi demonstrado que o processamento de HUAP atingiu uma temperatura máxima de $84,88 \pm 3,01$ °C por aproximadamente 0,7 segundos.

Segundo FOX & MCSWEENEY (1998) a caseína é uma proteína muito estável a altas temperaturas, sendo possível tratar o leite em seu pH natural (ao redor de 6.7) a 100°C por 24 horas sem causar sua coagulação, podendo resistir até mesmo a tratamentos tão severos quanto a exposição a 140°C por até 20 minutos. Portanto, a temperatura gerada e o tempo de exposição do leite durante o tratamento de HUAP não deve proporcionar nenhum nível de desestabilização térmica da fração de caseína.

3.2. Determinação da composição centesimal de caseína liofilizada

A Tabela 2.1 apresenta a caracterização centesimal em base seca da caseína obtida a partir do leite sem tratamento e do leite processado em diferentes níveis de pressão. A caseína foi obtida a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos e as análises feitas em triplicata.

Tabela 2.1: Composição centesimal em base seca de caseína liofilizada obtida à partir de leite desnatado processado em diferentes níveis de HUAP

Pressão (MPa)	Proteína	Gordura	Cinzas	Carboidrato
0	$60,35 \pm 0,33^a$	$17,22 \pm 1,61^a$	$5,91 \pm 0,14^a$	$16,52 \pm 1,21^a$
100	$54,66 \pm 2,22^b$	$22,30 \pm 2,64^b$	$7,06 \pm 0,04^b$	$15,98 \pm 0,68^a$
200	$54,58 \pm 0,26^b$	$23,01 \pm 0,84^b$	$7,41 \pm 0,05^b$	$15,00 \pm 0,86^a$
300	$54,66 \pm 0,57^b$	$20,98 \pm 2,09^b$	$7,37 \pm 0,65^b$	$16,99 \pm 1,78^a$

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Existe diferença em alguns aspectos da composição centesimal das caseínas liofilizadas obtidas. A principal diferença está na quantidade maior de proteína e menor de gordura presentes na caseína obtida do leite não homogeneizado.

É importante ressaltar que na literatura pesquisada não foi encontrado nenhum trabalho com a mesma metodologia utilizada no presente estudo. As pesquisas realizadas avaliando a alteração de propriedades funcionais de frações proteicas têm sido realizadas utilizando extratos comerciais e submetendo a solução destes extratos a processamentos de alta pressão. O presente estudo avaliou se o tratamento do leite *in natura* pode alterar a configuração das proteínas e só então isolar as diferentes frações por diferentes métodos, avaliando assim se as alterações causadas se refletem em uma proteína de funcionalidade diferenciada.

Para explicar as diferenças encontradas na composição centesimal das proteínas obtidas de leite tratado em diferentes níveis de pressão, é interessante avaliar duas considerações sobre os resultados apresentados.

Primeiramente, ao analisarmos a composição da caseína considerando o extrato seco desengordurado, os valores de proteína não apresentam variação estatisticamente significativa entre eles. Os valores encontrados neste caso são: $73,37 \pm 2,19$ para o leite sem tratamento; $71,31 \pm 2,80$ para o nível 100 MPa; $70,45 \pm 1,57$ para o nível 200 MPa e $63,43 \pm 7,18$ para o nível 300 MPa.

Além disso, ao considerarmos a composição centesimal das proteínas de soro obtidas no mesmo processo de separação (resultados apresentados posteriormente no Capítulo 3), nota-se o efeito complementar, ou seja, os liofilizados de proteínas de soro obtidos do leite sem tratamento têm quantidade maior de gordura e menor de proteínas que os demais produtos obtidos dos leites processados em HUAP.

Por estas observações, podemos relacionar a diferença na composição centesimal com uma diferente configuração das proteínas antes e após o tratamento, o que conseqüentemente alterou sua capacidade em reter gordura na matriz proteica coagulada em pH 4.6, conforme método utilizado para separar a caseína e as proteínas do soro. Por isso, automaticamente, os precipitados de caseína com maior teor de gordura originaram sobrenadantes com menor teor de gordura e vice-versa.

3.3. Solubilidade

A solubilidade é uma importante propriedade funcional *per se* e também um importante pré-requisito para outras aplicações funcionais de proteínas. Sua determinação sob condições variadas (pH e força iônica) pode ser uma informação valiosa no histórico de obtenção do produto e no seu valor potencial em aplicações envolvendo formação de espuma e de emulsões. (MULVIHILL & FOX, 1983).

A Tabela 2.2 apresenta a solubilidade de caseína em diferentes pHs. A caseína foi obtida a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

Em nenhum pH ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre a solubilidade da caseína obtida de leite tratado a diferentes pressões. Isto indica que o tratamento de leite em HUAP até 300 MPa não altera significativamente a solubilidade da caseína em pH 3.5, 5.0 e 6.5.

Tabela 2.2: Solubilidade de caseína liofilizada obtida a partir de leite desnatado tratado em diferentes níveis de HUAP

Pressão (MPa)	pH 3.5	pH 5.0	pH 6.5
0	2,82 \pm 0,09 ^a	8,72 \pm 0,39 ^a	8,63 \pm 0,84 ^a
100	2,99 \pm 0,03 ^a	9,41 \pm 0,92 ^a	9,36 \pm 0,94 ^a
200	3,00 \pm 0,10 ^a	8,08 \pm 0,39 ^a	8,14 \pm 0,54 ^a
300	3,08 \pm 0,04 ^a	8,48 \pm 0,37 ^a	8,94 \pm 0,72 ^a

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Não foi encontrado nenhum dado na literatura pesquisada avaliando a solubilidade de caseína submetida a tratamentos de alta pressão, todas as referências encontradas utilizaram proteínas de soro ao invés de caseína.

A solubilidade das proteínas é afetada pelo pH, força iônica, temperatura, polaridade do solvente, condições do processamento, método de isolamento, interações com outros componentes do alimento e tratamentos mecânicos (SGARBIERI, 1996). A composição química e conformação das proteínas são influenciadas pelo procedimento usado para isolá-las (HEWEDI et al., 1985).

Os resultados encontrados neste estudo apresentam um comportamento único e difícil de correlacionar indiretamente com os resultados obtidos por outros autores usando proteínas do soro ou até mesmo caseína obtida por processos distintos separação e secagem.

Portanto, o que se pode concluir é que as mudanças na estrutura das micelas decorrentes do tratamento de HUAP não causam alteração de solubilidade das proteínas.

3.4. Aeração

3.4.1. Capacidade de Formação de Espuma

Capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade de espuma (EE) não são necessariamente sinônimos e muitas vezes não tem nem mesmo uma correlação direta (MOHANTY et al., 1988). Além disso, segundo MULVIHILL & FOX (1983), qualquer condição de processo que cause desnaturação proteica pode também influenciar nas características da espuma.

A Figura 2.2 apresenta os resultados de capacidade de formação de espuma (CFE) de caseína obtida a partir de leite processado em diferentes níveis de HUAP. A caseína foi obtida a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

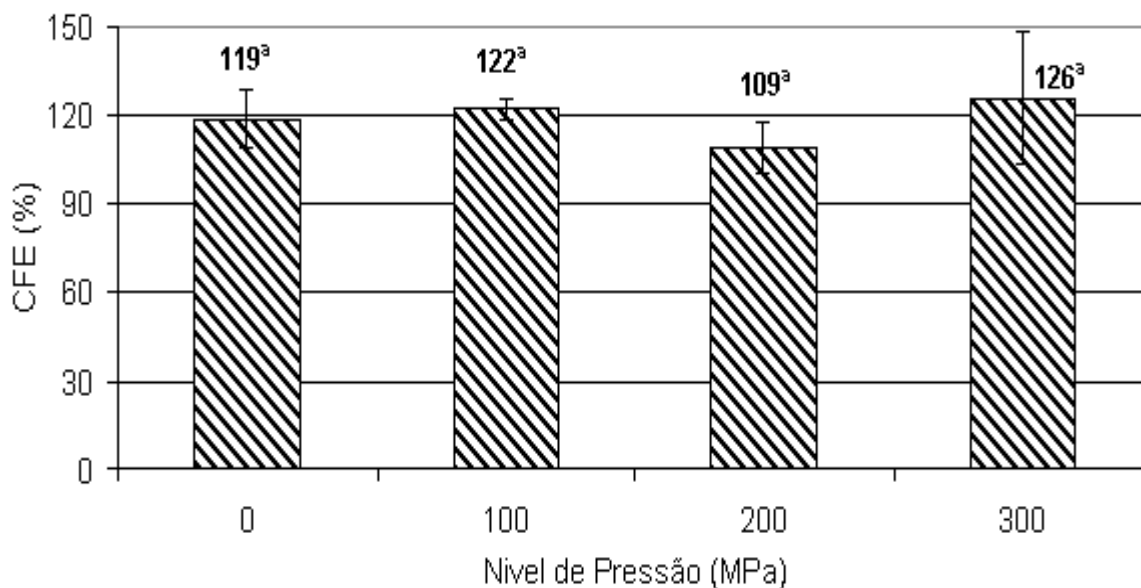


Figura 2.2: Capacidade de Formação de Espuma (CFE) de caseína obtida a partir de leite processado por HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Não foi encontrado nenhum efeito estatisticamente significativo do tratamento sobre a caseína. As possíveis alterações estruturais causadas nas micelas de caseína pelo tratamento de homogeneização a alta pressão nos níveis aplicados não causou nenhuma alteração na capacidade de formação de espuma das mesmas.

Não foram encontrados até o momento trabalhos envolvendo HUAP, caseína e formação de espuma.

É importante ressaltar também que na literatura pesquisada não foi encontrado nenhum trabalho com a mesma metodologia do presente estudo. As pesquisas que avaliaram a alteração de propriedades funcionais de frações proteicas e altas pressões isostáticas foram realizadas utilizando extratos comerciais e submetendo a solução destes extratos a processamentos de alta pressão, e não caseína obtida do leite processado a HUAP, como realizado no presente estudo.

PITTIA et al. (1996b) estudaram o efeito da alta pressão isostática de 300 MPa por 30 minutos sobre a fração β -caseína, e correlacionaram o tratamento com propriedades funcionais. Os autores descreveram um ligeiro decréscimo na capacidade de aeração e relacionaram este fato com a formação de agregados entre as moléculas após o tratamento, e conseqüentemente, uma menor disponibilidade de monômeros que são as moléculas mais prontamente disponíveis para formar a interface ar-líquido.

Por outro lado, DICKINSON et al. (1997) repetiram os estudos realizados por PITTIA et al. (1996) utilizando também β -caseína. Os autores utilizaram pressões isostáticas entre 0 e 800 MPa por 10 e 30 minutos. Os resultados indicaram não haver nenhuma influência significativa do tratamento sobre a tensão superficial e capacidade de aeração da mesma. Os autores atribuem estes resultados ao fato da molécula desta proteína já apresentar uma estrutura anfifílica muito pouco ordenada.

3.4.2. Estabilidade de Espuma

A caracterização da estabilidade de espuma (EE) utiliza basicamente dois procedimentos principais: drenagem de líquido e colapso de uma coluna de espuma (ELIZALDE et al., 1991).

A Figura 2.3 apresenta os resultados de volume de espuma obtidos com as diferentes caseínas liofilizadas obtidas de leite desnatado processado em HUAP.

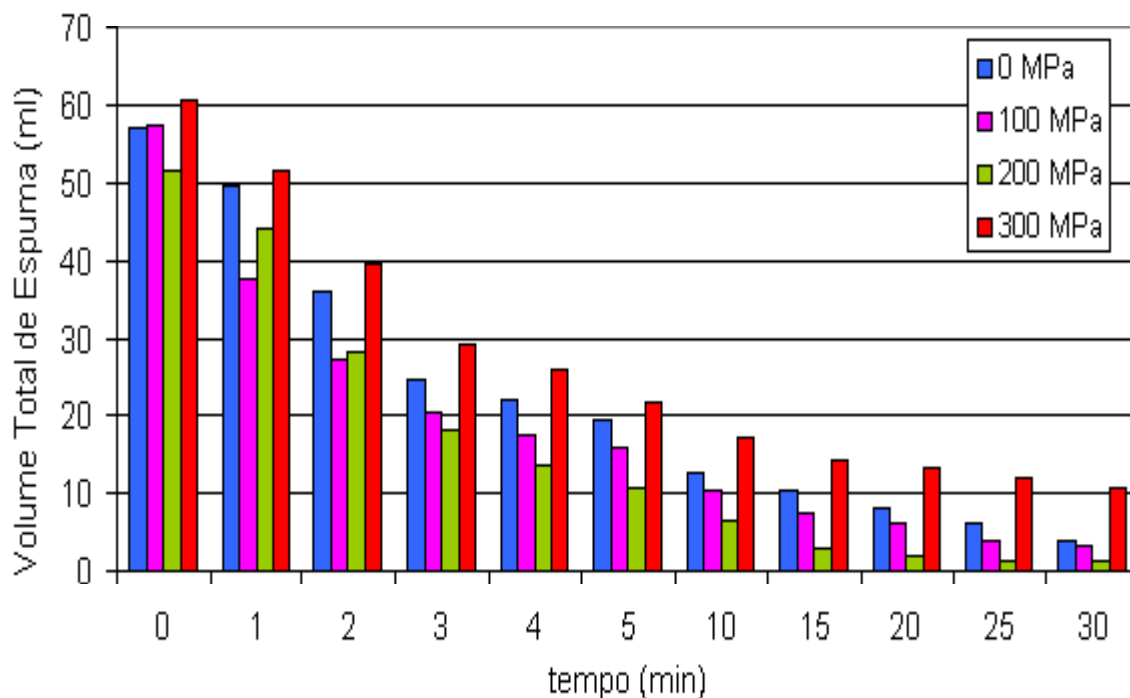


Figura 2.3: Variação do volume de espuma formada por caseína obtida de leite desnatado processado por HUAP

* Média de 5 medidas provenientes de 3 processamentos distintos.

Os resultados demonstraram que a espuma obtida pela caseína obtida de leite processado a 300 MPa é mais estável que as proteínas obtidas de leite homogeneizados em menor pressão. Após 30 minutos o volume de espuma da caseína obtida de leite processado a 300 MPa foi equivalente ao volume de espuma das demais amostras após 10 minutos.

Entretanto a análise de Estabilidade de Espuma evidencia mais claramente a diferença entre as amostras, pois exprime a variação percentual no volume de espuma inicial (0 minuto) e final (30 minutos).

A Figura 2.4 apresenta os valores de estabilidade de espuma (EE) obtidos em quintuplicata de análise para caseína obtida a partir de leite processado em diferentes níveis de HUAP.

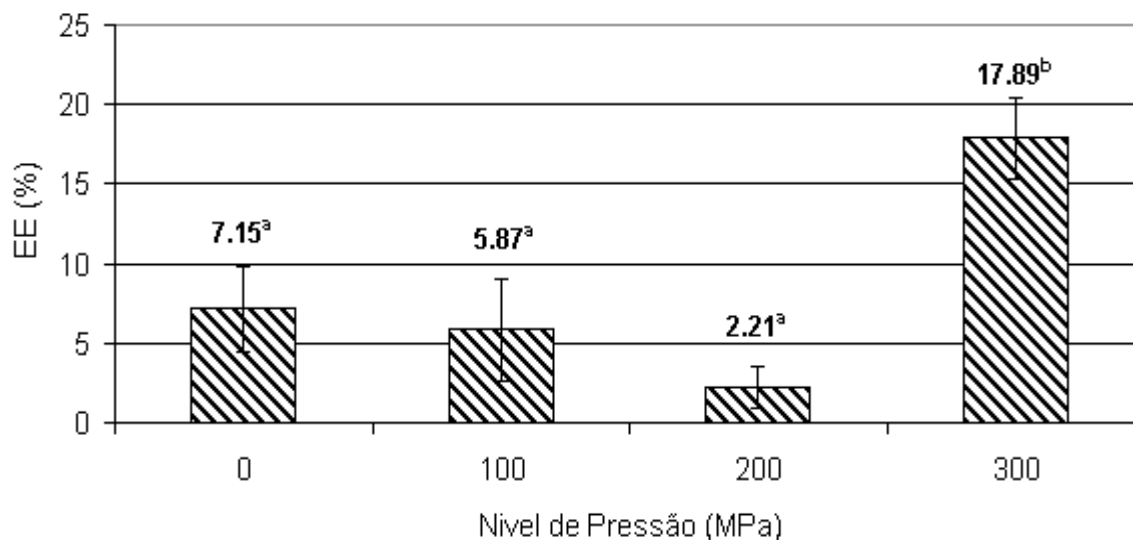


Figura 2.4: Estabilidade da Espuma (EE) formada por caseína obtida de leite desnatado processado em HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Os resultados evidenciam que as alterações estruturais causadas nas micelas de caseína pelo tratamento de homogeneização a ultra alta pressão em 300 MPa causaram alteração na estabilidade da espuma obtida, sendo a mesma maior que a do leite sem tratamento e que nos níveis menores de pressão. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre a caseína obtida de leite sem tratamento e de leite processado a 100 MPa e 200 MPa.

Não foram encontrados até o momento trabalhos envolvendo HUAP, caseína e estabilidade de espuma.

PITTIA et al. (1996b) ao estudar o efeito da alta pressão (300 MPa, 600 MPa e 900 MPa) sobre a fração β -caseína, demonstraram um aumento significativo na estabilidade de espuma formada. Este fato foi explicado pela formação de filmes mais espessos e mais elásticos que foram gerados pela reação entre as moléculas de β -caseína após o tratamento de alta pressão.

Por outro lado, DICKINSON et al. (1997) utilizando pressões isostáticas entre 0 e 800 MPa por 10 e 30 minutos indicaram não haver nenhuma influência significativa dos tratamentos sobre a tensão superficial e a estabilidade de espuma de β -caseína.

A melhora observada no presente estudo pode estar relacionada a dois fatores. Primeiro, a alteração de parte das micelas de caseína permitindo que as mesmas tenham maior elasticidade e formem filmes mais espessos. PITTIA et al. (1996b) descreveram

este efeito utilizando β -caseína. Segundo, conforme demonstrado no Capítulo 1, o tratamento por HAUP a 300 MPa aumentou a desnaturação das proteínas do soro e, conseqüentemente, a concentração das mesmas no precipitado de caseína. Este fato pode ter tido efeito complementar na estabilização da espuma.

A maior dificuldade em comparar dados de capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma é que, apesar de vários esforços de uma série de pesquisadores em criar uma metodologia padrão, ainda a maior parte dos estudos é feita com equipamentos diferentes, fato que tem intensa influência no resultado.

3.5. Emulsificação

Dois procedimentos principais têm sido adotados para determinar as propriedades emulsificantes de proteínas em sistemas modelos: (1) medida da capacidade emulsificante e (2) medida da estabilidade da emulsão (MULVIHILL & FOX, 1983).

A Figura 2.5 apresenta a Capacidade Emulsificante (CE) para caseína obtida de leite desnatado processado por HUAP. Os dados são provenientes de quintuplicata de análise para caseínas obtidas a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

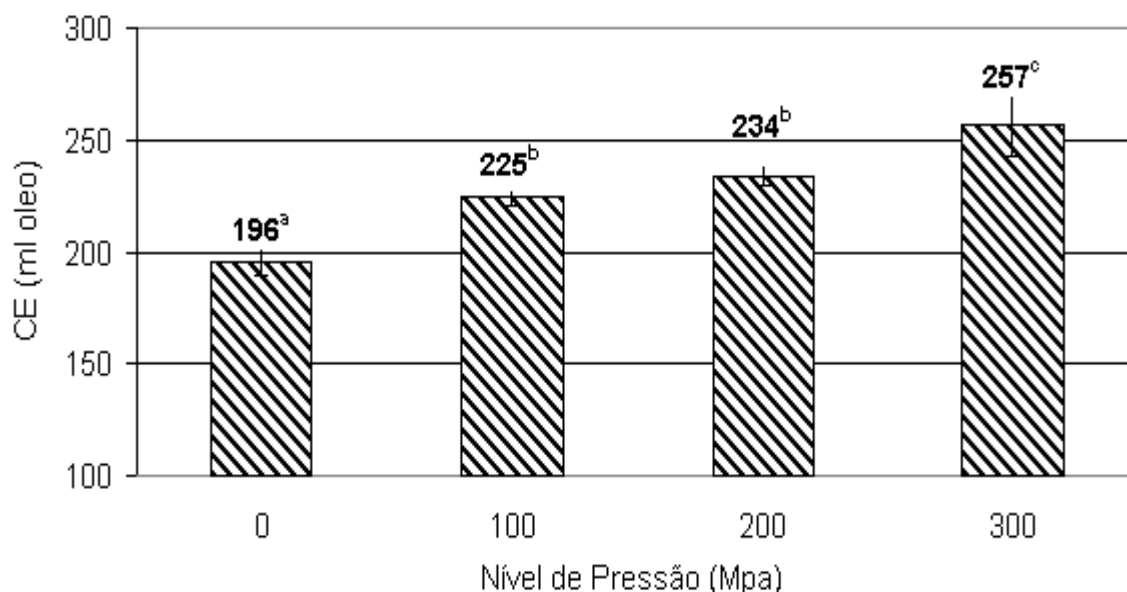


Figura 2.5: Capacidade Emulsificante (CE) de caseína obtida de leite desnatado processado em HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Nota-se um aumento progressivo da capacidade emulsificante com o aumento da pressão utilizada no tratamento HUAP. Os tratamentos de 100 MPa e 200 MPa não diferem entre si mas são maiores que a amostra sem tratamento e menores que o nível de 300 MPa. O nível de 300 MPa promoveu um aumento estatisticamente significativo maior que as demais amostras.

A Figura 2.6 apresenta a Estabilidade de Emulsão (EEm) após 2 horas para caseína obtida de leite desnatado processado por HUAP. Os dados foram obtidos em quintuplicata de análise para caseína obtida a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

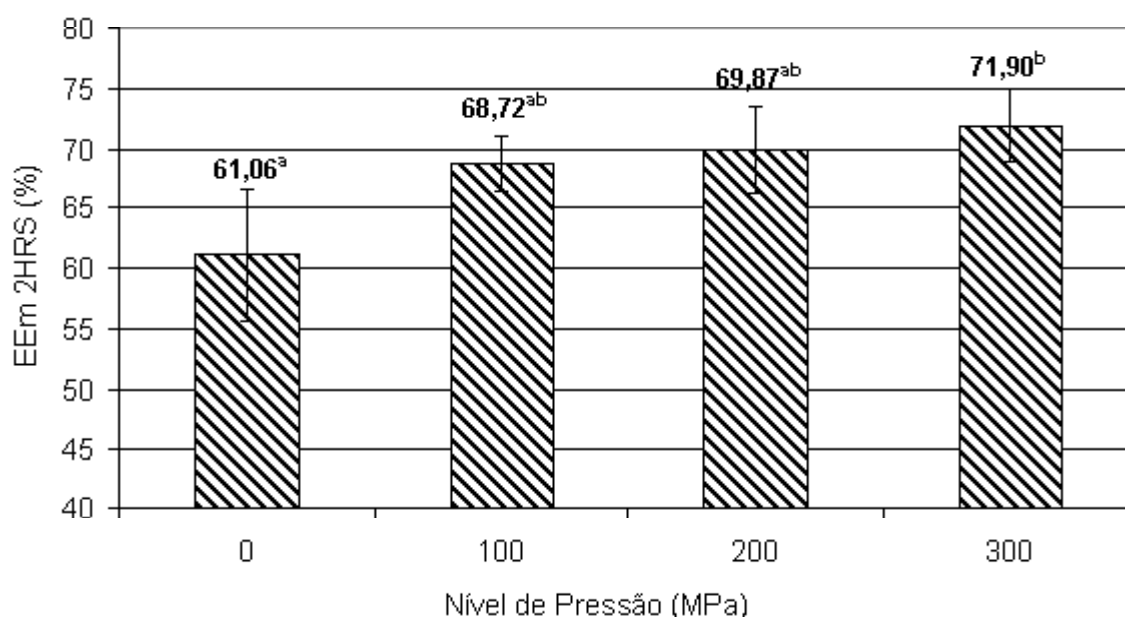


Figura 2.6: Estabilidade da Emulsão (EEm) de caseína obtida de leite desnatado processado em HUAP

Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Da mesma forma que para Capacidade Emulsificante, notou-se um aumento progressivo da estabilidade da emulsão com o aumento da pressão utilizada no tratamento HUAP. O tratamento de 300 MPa foi o único que proporcionou aumento estatisticamente significativo para os dois parâmetros frente ao leite sem tratamento.

Não foi encontrado nenhum dado na literatura pesquisada avaliando as propriedades emulsificantes de caseína submetida a tratamentos de alta pressão.

A melhora notada em capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão podem estar relacionadas com os mesmos dois fatores apresentados para o incremento da capacidade de formação de espuma e da estabilidade de espuma, uma vez que ambas são propriedades funcionais de superfície e dependem da capacidade da proteína de ser adsorvida na interface. Assim, a provável alteração de parte das micelas de caseína permite que as mesmas tenham maior elasticidade e formem filmes mais espessos. Além disso, é possível que a maior quantidade de proteínas de soro no liofilizado de leite submetido a tratamento em 300 MPa (conforme demonstrado no Capítulo 1) tenha contribuído na interação da interface óleo-água.

Assim como no caso de aeração e estabilidade de espuma, existe uma grande dificuldade em comparar dados de capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão, uma vez que apesar de vários esforços de uma série de pesquisadores em criar uma metodologia padrão, ainda a maior parte dos estudos é feita com equipamentos diferentes e em condições de solvente e concentração variados, fatos que têm intensa influência no resultado.

Outra maneira de avaliar o potencial de uma proteína em estabilizar uma emulsão é através do Índice de Atividade Emulsificante (IAE). A Figura 2.7 apresenta os resultados obtidos no presente estudo. Os dados foram obtidos em quintuplicata de análise para caseínas obtidas a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos. O IAE das amostras não variou com o tempo para todos os níveis de tratamento avaliados.

Em relação ao efeito do tratamento de HUAP nota-se que a caseína obtida de leite processado a 100 MPa apresentou um valor maior e estatisticamente significativo em relação a todas as demais amostras no tempo 0 minuto e 30 minutos. No tempo de medida de 20 minutos o valor para a amostra de 100 MPa foi maior mas não apresentou diferença estatisticamente significativa para os níveis 200 MPa e 300 MPa, mas ainda foi estatisticamente significativo em relação a amostra sem tratamento.

Os níveis 200 MPa e 300 MPa apresentaram valor intermediário entre a amostra sem tratamento e o nível 100MPa, mas nunca apresentaram diferença estatisticamente significativa para a amostra sem tratamento.

Outra constatação foi que todas as amostras apresentaram boa estabilidade durante os 30 minutos de medida, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre as medidas realizadas nos tempos 0 minuto, 10 minutos e 20 minutos para todas elas.

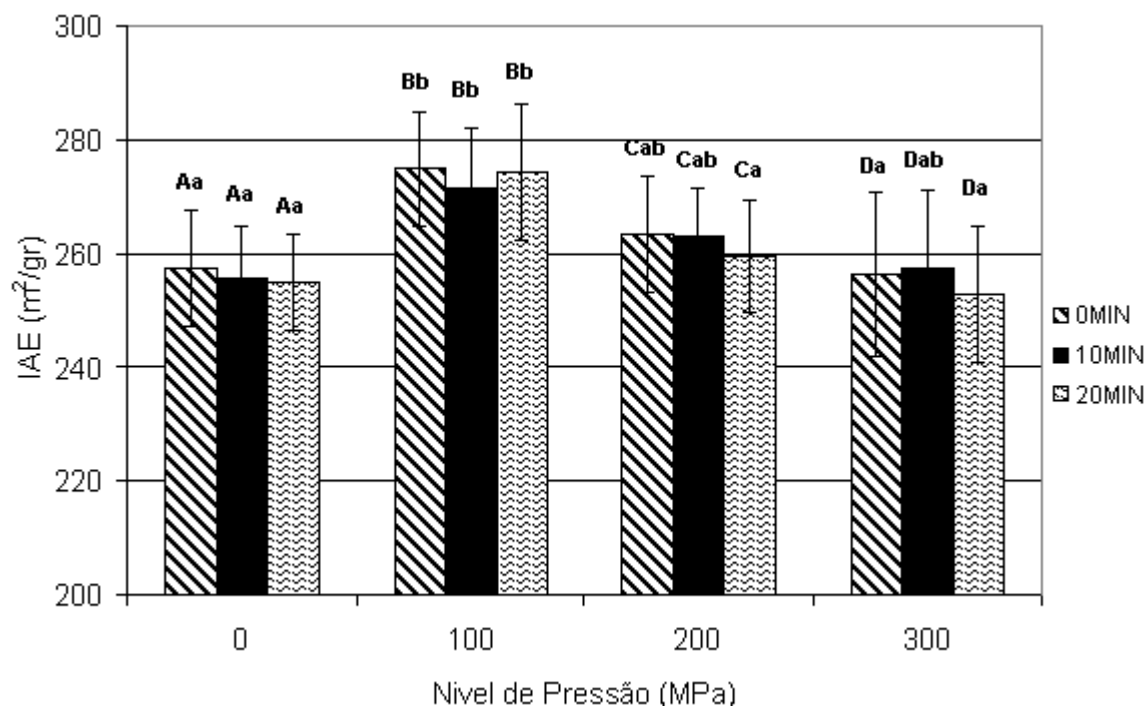


Figura 2.7: Índice de Atividade Emulsificante (IAE) de caseína liofilizada obtida a partir de leite desnatado processado em HUAP

* Média + Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

** Letras maiúsculas comparam medidas na mesma pressão e letras minúsculas comparam medidas no mesmo tempo.

Não foi encontrado nenhum dado na literatura pesquisada avaliando as propriedades emulsificantes de caseína submetida a tratamentos de HUAP.

Em tratamento isostático, DENDA & HAYASHI (1992) utilizando caseína comercial constataram apenas um ligeiro aumento no índice de atividade emulsificante desta proteína, quando processadas entre 200 MPa e 600 MPa. Apesar de não apresentarem resultados sobre a estrutura da matriz proteica, os autores associaram este comportamento à estabilidade da estrutura da caseína ao tratamento de alta pressão.

Os dados de IAE não apresentaram correlação com o valor de capacidade emulsificante.

4. Conclusões

O processamento de leite a HUAP é uma tecnologia viável e consistente, que possibilita algumas alterações físico-químicas, sobretudo no que tange à estrutura proteica, alterando propriedades funcionais de proteínas de interesse comercial.

O precipitado obtido por acidificação de leite a pH4,6 após processamento por homogeneização a ultra alta pressão pode ter sua composição centesimal alterada, provavelmente devido a matriz proteica formada durante a acidificação e a sua capacidade em reter mais ou menos gordura e água.

A maior parte das alterações é dependente do nível do tratamento. Dentre as funcionalidades avaliadas, a única propriedade que não apresentou nenhuma alteração com o tratamento foi a solubilidade, mesmo o leite tendo apresentado alteração na sua hidrofobicidade. É possível que o processo de extração tenha minimizado os efeitos hidrofílicos/hidrofóbicos e de cargas envolvidos no processo de solubilização.

Com relação às propriedades de superfície, emulsificação e aeração, houve aumento significativo na capacidade das proteínas interagirem com as fases óleo-água e ar-água. Com exceção do valor de IAE, este aumento foi, no geral, maior quanto maior foi a pressão aplicada e deve estar relacionado a dois fatores: a alteração de parte das micelas de caseína permitindo que as mesmas tenham maior elasticidade e formem filmes mais espessos na interface, e com a presença de proteínas de soro na caseína liofilizada, sendo que as mesmas podem ter ajudado também em melhorar as funções de aeração e emulsificação.

O efeito obtido atua significativamente tanto nas características de formação como de estabilidade da espuma e emulsão.

No caso da medição do Índice de atividade emulsificante, não houve correlação entre os resultados obtidos com os resultados de capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão.

Finalmente é importante destacar que na literatura existente, a avaliação do efeito do tratamento de alta pressão sobre as proteínas e sua funcionalidade é em geral realizada sob uma lógica diferente. Em geral se usam isolados proteicos comerciais e submetem-se as soluções puras destas proteínas a alta pressão, e portanto, não consideram possíveis interações entre as frações caseína e proteínas do soro.

5. Referências Bibliográficas

- ACTON, J. C.; SAFFLE, R. L. Stability of oil-in-water emulsions. 1 – Effect of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**, v. 35, n. 1, p. 852-855, 1970.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. 13rd.ed. Washington, D. C., 1980.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BOUAOUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v.16, p. 275-284, 2006.
- DATTA, N.; HAYES, M. G.; DEETH, H. C.; KELLY, A. L. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 393-399, 2005.
- De KANTEREWICZ, R. J.; ELIZALDE, B. E.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Water-Oil Absorption Index (WOAI): A simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 5, p. 1381-1383, 1987.
- DENDA, A. & HAYASHI, R. Emulsifying properties of pressure treated proteins. In: BALNY, C.; HAYASHI, R.; HEREMANS, K.; MASSON, P. **High pressure and biotechnology**. (Ed). Montrouge: John Libbey Eurotext, 1992. p. 185-192.
- DICKINSON, E.; MURRAY, B. S.; PAWLOWSKY, K. On the effect of high pressure treatment on the surface activity of β -casein. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 4, p. 507-509, 1997.
- ELIZALDE, B. E.; GIACCAGLIA, D.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Kinetics Of Liquid Drainage From Protein-Stabilized Foams. **Journal Of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 24-30, 1991.
- FOX, P. F. The milk protein system. In: FOX, P. F. **Developments in dairy chemistry - 4**. (Ed). New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1989. p. 1-53.
- FOX, P. F. & McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: FOX, P. F. **Dairy chemistry and Biochemistry**. (Ed). London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 147-238.

- GOMES, F. P. Curso de Estatística Experimental. 10 ed, São Paulo: Nobel. 430p. 1982.
- GUERZONI, M. E.; VANININI, L.; CHAVES LOPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GIANOTTI, A. Effect of high pressure homogenisation on microbial and physico-chemical characteristics of goat cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 851-862, 1999.
- HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy research**, V.70, p.297-305, 2003.
- HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. **Journal of Dairy research**, V.72, p.25-33, 2005.
- HEWEDI, M. M.; MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. Recovery of milk protein by ethanol precipitation. **Irish Journal of Food Science and Technology**, v.9, p. 11-23, 1985
- HILL, S. E. emulsions and foams. In: HILL, S. E.; LEDWARD, D. A.; MITCHELL, J. R. **Functional properties of food macromolecules**. (Ed). Gaithersburg, Mariland: Chapman & Hall Food Science Book, 1998. p. 302-334.
- HUMBERT, G.; DRIOU, A.; GUERIN, J.; ALAIS, C. Effets de l'homogénéisation à haute pression sur les propriétés du lait et son aptitude à la coagulation enzymatique. **Le lait**, v. 60, p. 574-594, 1980.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Determination of the casein content of milk**. IDF Standard nº29, IDF, Brussels, Belgium, 1964.
- LOPEZ-FANDINO, R., CARRASCOSA, A. V., OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. **Journal of Dairy Science** v.79, p.924-936, 1996.
- LOPEZ-FANDINO, R.; DE LA FUENTE, M. A.; RAMOS, M.; OLANO, A. Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurized milks from different species. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p.69-78, 1998.
- LOPEZ-FANDINO, R. High pressure induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. **International Dairy Journal**, v. 16, p.1119-1131, 2006.
- MCELWAIN, M. D.; RICHARDSON, T.; AMUDSON, C. H.; Some functional properties of succinylated single cell protein concentrate. **Journal of Milk Food Technology**, v. 38, n. 9, p. 521-526, 1975.

- MOHANTY, B.; MULVIHILL, D. M.; FOX, P. E. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. **Food Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 17-30, 1988.
- MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. P.; VAN-BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1715-1718, 1985.
- MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. Assessment of the functional properties of milk protein products. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 209, p. 3-11, 1983.
- PATEL, P. D.; STRIPP, A. M.; FRY, J. C. Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 57-63, 1988.
- PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.26, n.3, p.716-723, 1978.
- PHILLIPS, L. G.; GERMAN, J. B.; O'NEIL, T. E.; FOEGEDING, E. A.; HARWALKAR, V. A.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E.; MORR, C. V.; REGENSTEIN, J. M.; SMITH, D. M.; KINSELLA, J. E. Standardized procedure for measuring foaming properties of 3 proteins, a collaborative study. **Journal of Food Science** v.55, n.5, p.1441-1453, 1990.
- PITTIA, P.; WILDE, P. J.; HUSBAND, F. A.; CLARK, C. C. Functional and structural properties of β -lactoglobulin as affected by high pressure treatment. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1123-1128, 1996.
- PITTIA, P.; WILDE, P. J.; CLARK, D. C. The foaming properties of native and pressure treated β -casein. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 3, p. 335-342, 1996b.
- ROMAN, J. A. **Propriedades físico-químicas, nutritivas e funcionais da caseína de leite bovino obtida por diferentes processos**. 2002. 163 p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais das proteínas e alimentos proteicos. In: SGARBIERI, V. C. (Ed). **Proteínas em Alimentos Proteicos**. Campinas: Ed Varela, 1996. p. 259-271.

CAPÍTULO 3 – Propriedades Funcionais de Proteínas do Soro Obtidas a Partir de Leite Processado por Homogeneização a Ultra Alta Pressão

Resumo

As proteínas do soro têm sido largamente utilizadas na indústria de alimentos devido a suas propriedades funcionais. O uso da alta pressão em equipamentos do tipo isostático e de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) tem sido considerado uma ótima alternativa para alterar ou otimizar as propriedades funcionais de proteínas. Neste estudo leite desnatado foi submetido a tratamento de HUAP em diferentes níveis (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa) e as proteínas do soro foram obtidas através de acidificação do leite a pH 4,6 seguido de centrifugação. As proteínas de soro foram então neutralizadas a pH 6,7 e liofilizadas. Foram avaliadas as seguintes propriedades funcionais das proteínas de soro liofilizadas (PSL): solubilidade, capacidade de formação de espuma, estabilidade de espuma, capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão. O processamento de HUAP a 100 MPa e 200 MPa diminuiu a solubilidade das PSL nos pHs 3,5 e 5,0; mas não alterou a solubilidade de nenhum deles no pH 6,5. As propriedades de aeração (capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma) foram maiores para as PSL obtidas de leite tratado a 300 MPa. Não houve alteração da capacidade emulsificante e da estabilidade da emulsão em nenhum nível de processamento. Foi avaliado também o índice de atividade emulsificante das PSL e houve correlação com os resultados de estabilidade da emulsão.

Summary

The whey proteins have been extensively used at the food industry thanks to its functional properties. Among the options, the high-pressure treatments using, either the high hydrostatic pressure either the ultra high-pressure homogenization (UHPH), has been considered an excellent alternative to modify or to optimize the superficial properties of proteins. At this study we have evaluated some functional properties of whey proteins obtained from raw skimmed milk previously treated by UHPH at different pressure levels (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa). The whey proteins have been isolated by acidification of the milk at pH 4,6 and centrifugation. The whey has been neutralized to pH 6,7 and then freeze-dried. The following properties have been evaluated: solubility, foaming capacity, foam stability, emulsifying capacity and emulsion stability. UHPH decreased the solubility of the whey proteins obtained from milk treated at 100 MPa and 200 MPa at pHs 3,5 and 5,0, but did not cause any modification at pH 6,5. The foaming properties (foaming capacity and foam stability) increased for the whey protein obtained from milk treated at 300 MPa. No change has been noted at emulsifying capacity and emulsion stability for any treatment level. The emulsifying activity index (EAI) has also been evaluated and it has presented correlation with the emulsion stability.

1. Introdução

Proteínas de várias fontes têm sido investigadas como proteínas funcionais. O leite é fonte de pelo menos 7 proteínas funcionais com propriedades significativamente diferentes: caseína ácida, caseína enzimática, caseinatos, co-precipitados de caseína e proteínas do soro, concentrados e isolados de proteínas do soro e lactoalbumina (Mulvihill & FOX, 1983).

As proteínas do soro representam 20% das proteínas do leite. As duas principais proteínas do soro são α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, que representam 70-80% das proteínas totais do soro (SGARBIERI, 1996). Além delas existem ainda a BSA, Imunoglobulinas lactotransferrina e soro-transferrina entre outros.

Em contraste com as caseínas, as proteínas do soro têm uma estrutura globular, que é estabilizada por pontes dissulfeto intramoleculares através de resíduos de cisteína (McCRAE et al., 1999). As proteínas do soro apresentam altos níveis de estrutura secundária e terciária sendo, portanto, susceptíveis a desnaturação por vários agentes, inclusive pelo calor. A ordem de estabilidade térmica das proteínas do soro medido por perda de solubilidade é: α -lactoalbumina > β -lactoglobulina > BSA > Imunoglobulinas, sendo que especificamente as frações α -lactoalbumina > β -lactoglobulina têm sua ordem de reação de desnaturação aumentada a partir de 90°C. Entretanto com o uso de outras técnicas, como por exemplo a calorimetria, esta ordem de sensibilidade pode variar (FOX & MCSEENEY, 1998).

Outra particularidade importante sob o ponto de vista tecnológico das frações α -lactoalbumina e β -lactoglobulina é sua capacidade de reagir com a κ -caseína através do grupo cisteína de sua molécula após sofre desnaturação térmica, afetando a suscetibilidade da caseína a precipitação por quimosina e alterando a estabilidade térmica do leite.

O termo propriedade funcional da proteína, em relação aos alimentos, refere-se às propriedades físico-químicas das proteínas que afetam a funcionalidade dos alimentos, como a textura, cor, sabor e aroma, absorção/ligação de água e estabilidade. Algumas das mais importantes propriedades físico-químicas são a solubilidade, hidratação, atividade de superfície e geleificação (FOX & McSWEENEY, 1998).

Algumas das propriedades funcionais das proteínas dependem de mais de uma característica. Por exemplo, a geleificação, viscosidade e solubilidade dependem da interação proteína-proteína e da interação proteína-água (DAMODARAM, 1993 APUD

ROMAN, 2002). Sendo assim, quando inseridas em sistemas diferentes apresentarão características diferentes.

Segundo SGARBIERI (1996), a solubilidade é uma propriedade físico-química fundamental das proteínas e relaciona-se diretamente com a funcionalidade das proteínas no alimento. A solubilidade das proteínas é afetada pelo pH, força iônica, temperatura, polaridade do solvente, condições do processamento, método de isolamento, interações com outros componentes do alimento e tratamentos mecânicos. Estes agentes afetam a solubilidade das proteínas principalmente causando alterações nas interações hidrofílicas e hidrofóbicas da superfície da proteína.

As propriedades de superfície dependem da formação de películas bipolares na interface entre duas fases imiscíveis, como as propriedades emulsificantes e espumantes (SGARBIERI, 1996). O sucesso do uso destas proteínas está relacionado com: (1) a sua capacidade de adsorver na interface óleo-água formando uma barreira protetora que evita a coalescência das gotas de óleo, a qual está relacionada com a hidrofobicidade da molécula, e (2) a flexibilidade da proteína, que determina a habilidade da mesma em recobrir a maior área possível das gotas de óleo (McCRAE et al., 1999). A emulsificação e aeração dependem da solubilidade, hidrofobicidade, e do tamanho molecular (DAMODARAM, 1993 APUD ROMAN, 2002).

Tratamentos de alta pressão influenciam especificamente as propriedades físico-químicas e funcionais de proteínas através da ruptura e recuperação de pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas e iônicas. Isto significa que a alta pressão rompe a estrutura terciária e quaternária de proteínas globulares, e tem pouco efeito sobre as estrutura secundária (GALAZKA et al., 2000). Estas alterações dependem da estrutura da proteína, do nível de pressão, da temperatura, pH, força iônica e concentração da proteína (LOPEZ-FANDINO, 2006).

Já está bem estabelecido que proteínas globulares podem sofrer alterações macromoleculares de conformação após tratamento de alta pressão. E portanto o potencial de modificar as propriedades funcionais de superfície destas proteínas (GALAZKA et al., 1996). As mudanças induzidas pelo tratamento de alta pressão tendem, em geral, a aumentar a área de acesso ao solvente, e conseqüentemente, melhorar as propriedades de superfícies da proteína e sua funcionalidade dentro do sistema (PITTIA et al., 1996).

Mais recentemente a tecnologia de Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) tem sido desenvolvida como alternativa tanto ao tratamento térmico como ao processo isostático de alta pressão (BOUAOUINA et al., 2006).

A HUAP tem sido proposta como alternativa efetiva para a pasteurização de leite e provavelmente compartilha alguns mecanismos de ação com o tratamento isostático. Todavia, a dinâmica do processo das duas tecnologias não é similar (GUERZONI et al., 1999). Portanto, é possível que também as alterações na estrutura das proteínas ocorra de maneira diferenciada, resultando em alterações e efeitos também diferenciados.

SUBIRADE et al. (1998) sugerem que a arquitetura da β -lactoglobulina submetida a tratamento de HUAP é modificada e mantida por interações diferentes antes e após o tratamento. BOUAOUINA et al. (2006) demonstraram efeito do tratamento HUAP na conformação, hidrofobicidade e tamanho das moléculas de isolado proteico de soro submetido, e com isso notaram alterações em propriedades funcionais como capacidade de formação e estabilidade de espuma.

Portanto, o objetivo deste capítulo é avaliar se o tratamento de leite desnatado em diferentes níveis de homogeneização a ultra alta pressão, causa alterações estruturais nas proteínas do soro, que possam ser aproveitadas através da separação e liofilização destas proteínas, para com isso obter performances diferenciadas em três das principais características funcionais das proteínas : solubilidade, aeração e emulsificação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Matéria-prima

Foi utilizado leite cru desnatado obtido sempre na Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas, Jaguariúna, SP. O leite foi recolhido na manhã do mesmo dia de cada processamento e mantido em estocagem refrigerada (8°C) até o momento de sua utilização.

2.2. Processamento do Leite

O leite foi processado em equipamento de homogeneização contínuo do tipo homogeneizador de Ultra Alta Pressão, modelo nG7400H:350 fabricado por Stansted Fluid Power Ltda., Essex, Inglaterra. As condições de processo e procedimentos de trabalho foram iguais aos descritos no Capítulo 1 deste estudo.

Cada processo foi monitorado com termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer, posicionados em 4 pontos : entrada do produto, entrada da válvula de homogeneização, saída da válvula de homogeneização e saída do trocador de calor.

Ao fim de cada processo o equipamento foi higienizado pelo enxágüe com água, seguido de soda 2,5%, novamente enxaguado com água, e finalmente preenchido com álcool 70% (v/v), que foi mantido durante pelo menos 24 horas dentro do equipamento.

Foi realizada triplicata de processo em cada nível de pressão avaliado.

2.3. Obtenção das proteínas do soro

A extração das proteínas do soro consistiu em misturar quantidades definidas de leite, água, ácido acético e acetato em condições controladas de temperatura promovendo a precipitação de parte das proteínas do leite, conforme descrito pela metodologia IDF nº 29 (1964).

A mistura foi então centrifugada a temperatura ambiente a 4500 rpm por 15 minutos (Figura 3.1), em centrífuga refrigerada FANEM modelo FR22 e o sobrenadante filtrado em papel Whatman nº 49, conforme LOPEZ-FANDINO et al. (1996).

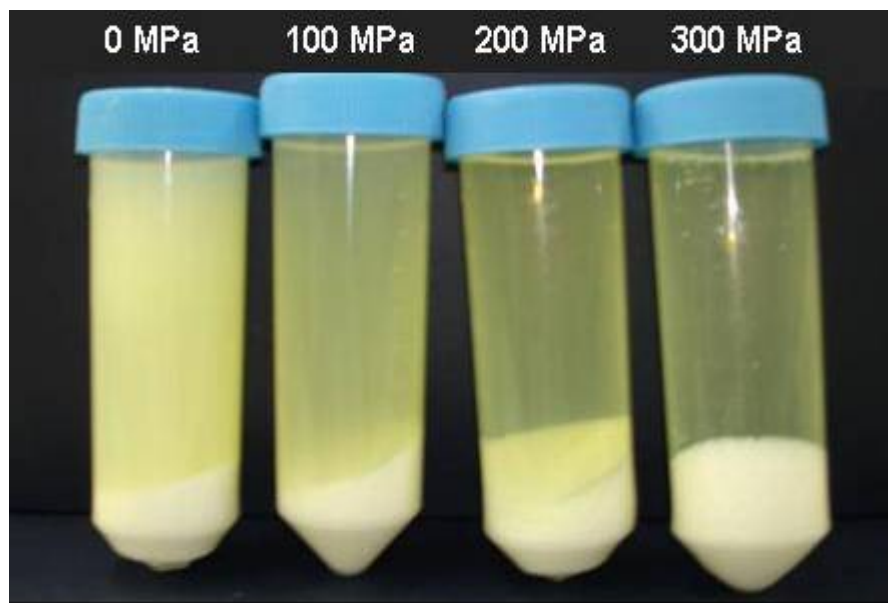


Figura 3.1: Sobrenadante e precipitado obtidos no processo de obtenção das proteínas do soro

2.4. Liofilização

Os filtrados obtidos pelo processo descrito anteriormente (item 2.3) foram pesados e liofilizados à vácuo (0,06 atm) em liofilizador EDWARDS modelo Super Modulyo em temperatura de -40°C por período de 48 horas. As amostras de proteína de soro retiradas do liofilizador foram homogeneizadas em triturador de hélice (liquidificador).

As amostras de proteínas do soro liofilizadas de 3 processamentos distintos, realizados com matérias-primas distintas foram misturadas, homogeneizadas e mantidas sob refrigeração de -18°C até o momento de sua utilização nos testes de funcionalidade.

2.5. Determinação da composição centesimal de proteínas do soro liofilizadas

As proteínas de soro liofilizadas obtidas dos leites submetidos a cada nível de tratamento de alta pressão foram analisadas em triplicata para determinação de sua composição centesimal. A quantificação de umidade, resíduo mineral (cinzas) e nitrogênio total foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no A.O.A.C. (1980). Os lipídios totais foram determinados pelo método descrito por BLIGH & DYER (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (na proporção 10:20:8, respectivamente) para extração dos lipídios. Os carboidratos foram determinados por

diferença, subtraindo de 100% a soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

2.6. Solubilidade

A solubilidade proteica (SP) foi determinada de acordo com o método de MORR et al. (1985), que consiste em uma modificação do método de determinação do índice de nitrogênio solúvel. Foi estudado o efeito da variação de pH, nos níveis de 3,5, 5,0 e 6,5, sobre a solubilidade dos extratos.

Para cada amostra foi pesado 500 mg de proteína em béquer de 50 mL. Foram adicionadas alíquotas de NaCl 0,1M com agitação manual até a formação de uma pasta, em seguida foi adicionado mais NaCl 0,1M até o volume de 40 mL e agitado em agitador magnético. O pH da solução foi ajustado ao nível desejado, 3,5, 5,0 ou 6,5, com solução de HCl 1N e 0,1N ou NaOH 0,1N. A dispersão foi mantida sob agitação por 1 hora e o pH monitorado e mantido no nível desejado. A amostra foi então transferida para um balão volumétrico de 50 mL e diluída até a marca com mais solução de NaCl 0,1M.

A solução foi centrifugada por 30 minutos a 5500 rpm, em centrífuga FANEM modelo FR22 e a quantidade de proteína solúvel do sobrenadante determinada pelo método de micro-Kjeldahl, considerando o fator de multiplicação de 6,38 (A.O.A.C., 1980). A solubilidade de proteína calculada pela fórmula:

$$SP (\%) = \frac{\text{concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL)} \times 50}{\text{peso da amostra (mg)} \times \text{conteúdo de proteína da amostra (\%)}} \times 100$$

100

Cada amostra foi analisada em triplicata, e cada uma delas em triplicata para porcentagem de proteína.

2.7. Aeração

As avaliações de aeração foram realizadas considerando dois fatores:

2.7.1. Capacidade de Formação de Espuma

O método de avaliação utilizado foi descrito por PHILLIPS et al. (1990) e a capacidade de formação de espuma calculada segundo MOHANTY et al. (1988), pela fórmula descrita abaixo:

$$\text{CFE (\%)} = \frac{\text{Volume de espuma em tempo 0 minutos (mL)}}{\text{Volume original da solução de proteína (mL)}} \times 100$$

A partir das amostras de proteína de soro liofilizada foram preparados 150 mL de solução 2,5% de proteína conforme metodologia de solubilização descrita por MORR et al. (1985). A solução teve seu pH ajustado a 7.0 com solução NaOH 0,1N.

Alíquotas de 50 mL da solução foram transferidas para um recipiente plástico apropriado mantido em banho de água para evitar o aumento da temperatura da solução e eventual perda de água por evaporação. A alíquota foi submetida a agitação de 10.000 rpm em Ultra-Turrax modelo T45-S5 da IKA-WERK por 15 minutos e a espuma formada foi transferida rapidamente para proveta graduada de 150 mL. O volume inicial de espuma foi medido e anotado.

Cada amostra foi analisada em quintuplicata.

2.7.2. Estabilidade da Espuma

A espuma foi deixada na proveta por 60 minutos. O volume da coluna de espuma e o volume da coluna de líquido foram anotados no transcorrer do tempo em 0,1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 minutos, para acompanhar a cinética de deterioração da mesma e avaliar a diferença entre as amostras.

A estabilidade da espuma será avaliada pela redução percentual do seu volume após 60 minutos em relação ao seu volume inicial, conforme descrito por PATEL et al. (1988).

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Volume de espuma após 60 minutos}}{\text{Volume inicial da espuma (V}_0\text{)}} \times 100$$

Cada amostra foi analisada em quintuplicata.

2.8. Emulsificação

As avaliações de emulsificação foram realizadas considerando 3 fatores :

2.8.1. Capacidade Emulsificante

A capacidade emulsificante de uma proteína é definida como a quantidade máxima de óleo que pode ser dispersa em fase aquosa para um dado procedimento experimental. A metodologia utilizada foi baseada no procedimento proposto por De KANTEREWICZ et al. (1987) e por MOHANTY et al. (1988).

A partir das amostras de proteína do soro liofilizada foram preparados 200 mL de solução 0,5% de proteína conforme metodologia de solubilização descrita por MORR et al. (1985). Alíquotas de 25 mL da solução foram transferidas para béquer plástico de 400 mL e misturadas com 25 mL de óleo de soja comercial, adicionado de corante Sudan III na proporção de 40 mg/L.

A mistura foi submetida a agitação em agitador de hélice Tecnal modelo TE-039, com velocidade inicial baixa (1000 rpm) durante 1 minuto, para formar a emulsão. A velocidade foi aumentada para 3200 rpm e iniciou-se a adição de mais óleo de soja por gotejamento, taxa aproximada de 0,1 mL/s, até o momento de quebra da emulsão, facilmente identificado por uma perda repentina de viscosidade.

A capacidade de emulsão (CE) foi expressa pela quantidade de óleo (mL) adicionado até o ponto de colapso da emulsão. Cada amostra, proveniente da mistura de proteínas de soro de 3 processos de alta pressão distintos, foi analisada em quintuplicata.

2.8.2. Estabilidade da emulsão

A metodologia utilizada foi baseada no procedimento proposto por ACTON & SAFFLE (1970) e MCELWAIN et al. (1975). As mesmas emulsões obtidas para a avaliação do IAE foram usadas neste procedimento. À partir das amostras de proteína do soro liofilizada foi preparado 200 mL de solução 0,5% de proteína conforme metodologia de solubilização descrita por MORR et al. (1985). Alíquotas de 60 mL da solução foram transferidas para recipiente plástico adequado e misturadas com 20 mL de óleo de soja

comercial. A mistura foi submetida a agitação de 10.000 rpm em Ultra-Turrax modelo T45-S5 da IKA-WERK por 1 minuto.

A umidade da emulsão recém preparada (U_0) e a umidade da emulsão mantida em estufa a 37°C após 2 horas (U_{2h}), foram determinadas segundo procedimento da A.O.A.C. (1980). A amostra de emulsão após 2 horas foi obtida retirando 5 mL da amostra do fundo do tubo de ensaio que continha 50 mL da emulsão.

Cada amostra, proveniente da mistura de proteínas de soro de 3 processos de alta pressão distintos, foi analisada em triplicata e a estabilidade da emulsão (EEm) foi calculada pela fórmula:

$$EEm (\%) = \frac{100 - U_{2h}}{100 - U_0} \times 100$$

2.8.3. Índice de atividade emulsificante

A metodologia utilizada foi realizada conforme procedimento proposto por PEARCE & KINSELLA (1978).

A partir das amostras de proteína do soro liofilizada foram preparados 200 mL de solução 0,5% de proteína conforme metodologia de solubilização descrita por MORR et al. (1985). Alíquotas de 60 mL da solução foram transferidas para recipiente plástico adequado e misturadas com 20 mL de óleo de soja comercial. A mistura foi submetida a agitação de 10.000 rpm em Ultra-Turrax modelo T45-S5 da IKA-WERK por 1 minuto.

Ao fim do processo, 1 mL da emulsão foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e diluído até a marca com uma solução de SDS a 0,1%. À partir da nova solução foi pipetado 1 mL em tubo de ensaio contendo 4 mL da solução SDS 0,1%. A amostra de emulsão diluída no fator 1:500 foi utilizada para realizar as leituras de absorbância, feitas em espectrofotômetro MiltonRoy modelo Spectronic 21D, em cubeta de 1 cm de diâmetro e em comprimento de onda de 500 nm.

Cada amostra foi analisada em triplicata de análise (leitura no espectrofotômetro), e o processo de emulsificação realizado também em triplicata.

O índice de atividade emulsificante foi calculado pela fórmula:

$$IAE (m^2/gr) = \frac{2 \times 2,303 \times \text{absorbância} \times \text{fator de diluição da emulsão}}{\Phi \times C \times 10000}$$

Onde Φ = fração volumétrica do óleo, C = concentração de proteína na fase aquosa antes da emulsão e 10000 = fator de correção para metros quadrados.

Para o cálculo de Φ foi necessário monitorar a densidade do óleo, a densidade da solução proteica, a concentração de solutos na solução proteica e a concentração de sólidos na emulsão.

2.9. Tratamento de dados

Todos os resultados encontrados no estudo foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as possíveis diferenças entre médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (GOMES, 1982), utilizando-se o programa "Statística: Basic Statistics and Tables".

3. Resultados e Discussão

3.1. Processamento do Leite

O leite utilizado para a obtenção das proteínas de soro foi o mesmo utilizado para as determinações feitas durante o item 3.1 do Capítulo 1 do presente estudo. Foi constatado que o tratamento de HUAP causa um aumento estatisticamente significativo na temperatura do leite após a válvula de homogeneização (T3). Este aumento é linear e corresponde a 0,177°C/MPa.

Considerando o tempo estimado de retenção em alta temperatura e os dados apresentados por vários autores que estudaram a desnaturação térmica de proteínas do soro (BIKKER et al., 2000; ANEMA & MCKENNA, 1996; KESSLER & BEYER, 1991), a exposição do leite a 85°C por 1 segundo gera uma desnaturação inferior a 5%. Portanto, a maior parte das alterações avaliadas durante o presente estudo são provenientes do efeito conjunto de alta pressão e tratamento térmico, e dificilmente poderiam ser obtidas apenas pelo efeito do calor.

3.2. Determinação da composição centesimal de proteínas do soro liofilizadas

A Tabela 3.1 apresenta a caracterização centesimal em base seca das proteínas de soro obtidas a partir do leite sem tratamento e do leite processado em diferentes níveis de pressão. Os dados apresentados são a de triplicata de análise, e as proteínas de soro foram obtidas a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

Tabela 3.1: Composição centesimal em base seca de proteínas do soro liofilizadas obtidas a partir de leite desnatado processado em diferentes níveis de HUAP

Pressão (MPa)	Proteína	Gordura	Cinzas	Carboidrato
0	13,11 ± 0,24 ^a	2,33 ± 0,09 ^a	24,14 ± 1,14 ^a	60,42 ± 1,05 ^a
100	15,45 ± 0,34 ^b	1,01 ± 0,04 ^b	20,88 ± 2,81 ^a	62,65 ± 0,66 ^a
200	16,58 ± 0,06 ^b	0,92 ± 0,02 ^b	23,53 ± 0,80 ^a	58,97 ± 0,80 ^a
300	15,14 ± 0,18 ^b	0,33 ± 0,02 ^c	24,04 ± 2,00 ^a	60,79 ± 1,45 ^a

* Média ± Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Existe diferença em alguns aspectos da composição centesimal das proteínas do soro obtidas. A principal diferença está na quantidade menor de proteína e maior de gordura retido no produto obtido do leite não homogeneizado.

A discussão sobre tal diferença é complementar à discussão realizada no item 2.2 do Capítulo 2, onde a caseína liofilizada de leite sem tratamento apresentou maior teor de proteína e menor teor de gordura que as demais caseínas liofilizadas. Apresentando então um comportamento complementar ao notado para as proteínas de soro liofilizadas.

Pode-se então assumir que a diferença na composição centesimal é causada pela mudança na configuração das proteínas antes e após o tratamento, o que conseqüentemente alterou sua capacidade em reter gordura na matriz proteica coagulada em pH 4.6, conforme método utilizado para separar a caseína e as proteínas do soro. Os precipitados de caseína que tiveram maior teor de gordura resultaram automaticamente apresentando um soro com menor teor de gordura.

3.3. Solubilidade

A solubilidade é uma importante propriedade funcional *per se* e também um importante pré-requisito para outras aplicações funcionais de proteínas. Sua determinação sob condições variadas (pH e força iônica) pode ser uma informação valiosa sobre o histórico de obtenção do produto e seu valor potencial em aplicações envolvendo formação de espuma e de emulsões. (Mulvihill & FOX, 1983).

A Tabela 3.2 apresenta a solubilidade para as proteínas do soro em diferentes pHs. As proteínas de soro foram obtidas a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

Tabela 3.2: Solubilidade de proteínas de soro liofilizadas obtidas a partir de leite desnatado tratado em diferentes níveis de HUAP

Pressão (MPa)	pH 3.5	pH 5.0	pH 6.5
0	9,75 ± 0,21 ^a	9,63 ± 0,29 ^a	10,11 ± 0,18 ^a
100	8,54 ± 0,14 ^b	8,70 ± 0,04 ^b	8,70 ± 0,38 ^a
200	8,40 ± 0,32 ^b	8,62 ± 0,27 ^b	8,54 ± 0,34 ^a
300	9,26 ± 0,37 ^{ab}	9,14 ± 0,17 ^{ab}	8,71 ± 0,78 ^a

* Média ± Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Constatou-se que as proteínas de soro obtidas de leite tratado com 100 MPa e 200 MPa têm solubilidade menor e estatisticamente significativa que as proteínas de soro de

leite sem tratamento. As proteínas de soro obtidas do leite tratado a 300 MPa apresentaram solubilidade intermediária e não têm diferença estatisticamente significativa com nenhum dos níveis de pressão. Este comportamento foi válido para os pHs 3,5 e 5,0. No pH 6,5 apesar dos valores de todos os produtos obtidos de leite homogeneizado serem menores, não houve diferença estatisticamente significativa entre todos eles.

BOUAOUINA et al. (2006) usando homogeneização de ultra alta pressão entre 50 MPa e 300 MPa não constataram alteração na solubilidade de isolado proteico de soro para nenhum nível de pressão aplicada. Por outro lado, FLOURY et al. (2002) constataram diminuição da solubilidade da proteína 11S de soja quando a mesma foi submetida a tratamentos de HUAP de 250 MPa, e o efeito foi intensificado a 350 MPa. A perda de solubilidade é explicada pela desnaturação da mesma.

MOLINA et al. (2001) estudaram a solubilidade de isolado proteico de soja em dois níveis de pH (6,5 e 7,5) e a relação com tratamentos de alta pressão isostática variando entre 200 MPa e 600 MPa. A solubilidade sofre um ligeira alteração apenas a partir de 400 MPa em pH 6,5. Em todos os demais níveis não existe diferença estatisticamente significativa.

A alteração de solubilidade das proteínas de soro estudadas pode estar relacionada a maior exposição dos sítios hidrofóbicos como foi constatado na avaliação do leite tratado e demonstrado no Capítulo 1 deste trabalho. Com maior exposição de sítios hidrofóbicos torna-se mais difícil a solubilização das moléculas em água. No nível de 300 MPa a diferença com o padrão pode ter diminuído pois aproximadamente 20% das proteínas do soro são precipitadas (vide Capítulo 1), restando uma menor quantidade de proteínas desnaturadas no liofilizado.

3.4. Aeração

Durante a avaliação das propriedades de capacidade de formação de espuma de estabilidade de espuma é importante ressaltar que os estudos anteriores envolvendo alta pressão e formação de espuma não aplicaram o mesmo procedimento utilizado neste estudo. Estudos anteriores avaliaram soluções proteicas preparadas a partir de isolados proteicos comerciais submetidas ao tratamento de alta pressão, e não a utilização de proteínas de soro obtidas de leite processado em HUAP, como no presente estudo.

3.4.1. Capacidade de Formação de Espuma

Capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade de espuma (EE) não são necessariamente sinônimos e muitas vezes não tem nem mesmo uma correlação direta (MOHANTY et al., 1988). Além disso, segundo MULVIHILL & FOX (1983), qualquer condição de processo que cause desnaturação proteica pode também influenciar as características da espuma.

A Figura 3.2 apresenta a capacidade de formação de espuma (CFE) de proteínas do soro submetidas a diferentes níveis de processamento em HUAP. Os dados apresentados são provenientes de quintuplicata de análise, e as proteínas de soro foram obtidas a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

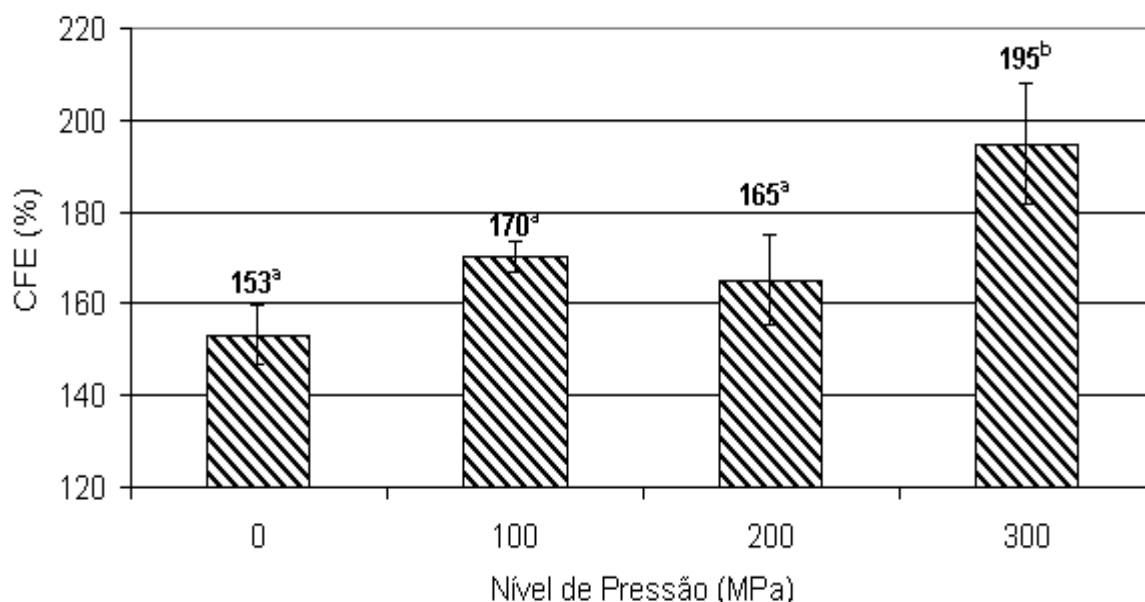


Figura 3.2: Capacidade de Formação de Espuma (CFE) de proteínas do soro obtidas a partir de leite processado por HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

O tratamento de homogeneização a alta pressão nos níveis aplicados causou alteração na capacidade de formação de espuma das proteínas de soro. Apesar de uma possível tendência em aumentar a capacidade de formação de espuma, os níveis de 100 MPa e 200 MPa não foram suficientes para trazer alterações estatisticamente

significativas. Por outro lado, 300 MPa originou um produto com maior capacidade de formação de espuma.

Os trabalhos em HUAP são bastante escassos neste tema. O único trabalho encontrado com tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão foi o de BOUAOUINA et al. (2006). Os autores aplicaram pressões de 50 MPa até 300 MPa em solução de isolado proteico e soro e encontram um aumento progressivo da capacidade de formação de espuma com o aumento da pressão aplicada. O aumento foi associado à diminuição do tamanho das moléculas e ao aumento da hidrofobicidade do sistema, permitindo assim uma adsorção mais rápida na interface ar-água. O resultado obtido pelos pesquisadores foi bastante similar ao resultado obtido neste estudo.

PITTIA et al. (1996) utilizando processamento de alta pressão isostática demonstraram que soluções de β -lactoglobulina tratadas entre 300 MPa e 900 MPa apresentaram redução na sua capacidade de formação de espuma, devido possivelmente a interação entre as moléculas desnaturadas no tratamento, evitando assim a boa adsorção destas moléculas ao redor das bolhas de ar.

Por outro lado, IBANOGLU & KARATAS (2001) demonstraram um aumento da capacidade de formação de espuma com o aumento do nível de pressão isostática aplicada entre 150 MPa e 450 MPa utilizando isolados proteicos de soro comerciais. Finalmente, IBANOGLU (2001) não observou nenhuma melhoria na capacidade de formação de espuma para soluções de β -lactoglobulina tratadas em pressão isostática variando entre 0 e 800 MPa.

3.4.2. Estabilidade de Espuma

A caracterização da estabilidade de espuma (EE) utiliza basicamente dois procedimentos principais: drenagem de líquido e colapso de uma coluna de espuma (ELIZALDE et al., 1991).

A Figura 3.3 apresenta os resultados de volume/colapso de espuma obtidos com as diferentes proteínas do soro liofilizadas.

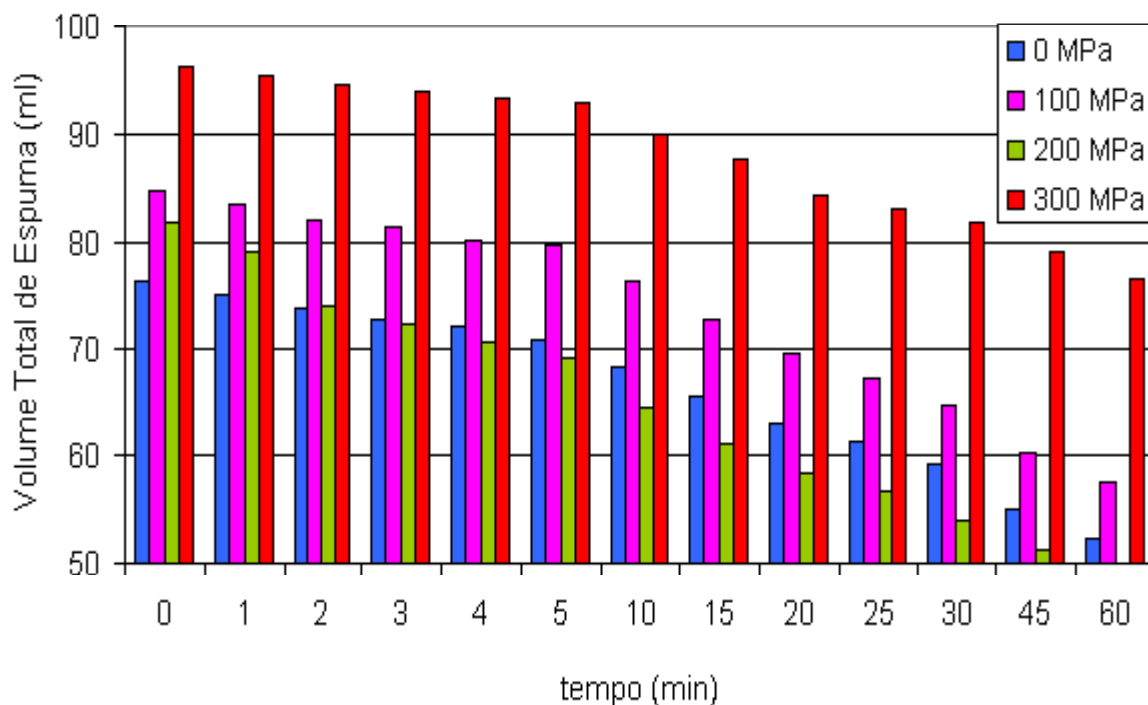


Figura 3.3: Variação do volume de espuma formada por proteínas de soro obtidas de leite desnatado processado por HUAP

* Média de 5 medidas provenientes de 3 processamentos distintos.

Para manter uma comparação mais clara, a análise de estabilidade de emulsão é que evidencia a diferença estatisticamente significativa pois exprime a variação percentual no volume de espuma inicial (0 minuto) e final (30 minutos).

Os valores de estabilidade de espuma (EE) obtidos são apresentados na figura 3.4. As proteínas de soro foram obtidas a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

O tratamento de homogeneização a ultra alta pressão causou alteração na estabilidade de espuma das proteínas de soro obtidas de leite tratado a 300 MPa, fato notado também no capítulo anterior para as caseínas liofilizadas.

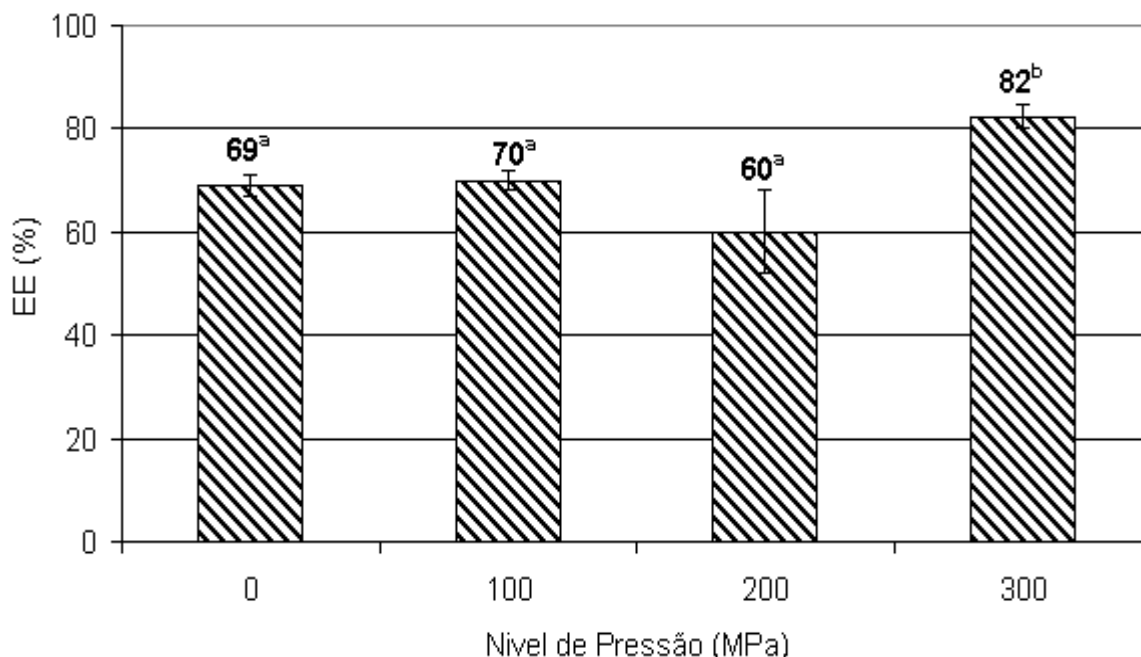


Figura 3.4: Estabilidade da Espuma (EE) formada por proteínas de soro obtidas de leite desnatado processado em HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Para a tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão, mais uma vez somente BOUAQUINA et al. (2006) avaliaram o efeito do tratamento sobre proteínas do soro. Os autores aplicaram pressões de 50 MPa até 300 MPa em solução de isolado proteico de soro, e encontram um aumento progressivo na estabilidade da espuma mas somente estatisticamente significativo a partir de 200 MPa. O aumento foi associado a diminuição do tamanho das moléculas e ao aumento da hidrofobicidade do sistema, permitindo assim uma adsorção mais rápida na interface ar-água.

IBANOGLU & KARATAS (2001) demonstraram um aumento da estabilidade da espuma de isolados proteicos de soro entre 150 MPa e 300 MPa, e posterior decréscimo ao nível inicial entre 300 MPa e 450 MPa. IBANOGLU (2001) não observou nenhuma melhoria na estabilidade de espumas obtidas a partir de soluções de β -lactoglobulina tratadas em pressão de 0 a 800 MPa.

A maior dificuldade em comparar dados de capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma é que, apesar de vários esforços de uma série de pesquisadores em criar uma metodologia padrão, ainda a maior parte dos estudos é feita com equipamentos diferentes, fato que tem intensa influência no resultado.

3.5. Emulsificação

Dois procedimentos principais têm sido adotados para determinar as propriedades emulsificantes de proteínas em sistemas modelos: (1) medida da capacidade emulsificante e (2) medida da estabilidade da emulsão (MULVIHILL & FOX, 1983).

É importante ressaltar que a avaliação das propriedades de emulsificação (capacidade emulsificante, estabilidade da emulsão e índice de atividade emulsificante) no presente estudo foram realizadas com um conceito diferente dos estudos anteriores. Bem como no caso de propriedades de aeração, estudos anteriores avaliaram soluções proteicas preparadas a partir de isolados proteicos comerciais submetidas ao tratamento de alta pressão, e não a utilização de proteínas de soro obtidas de leite processado em HUAP, como no presente estudo.

A Figura 3.5 apresenta a Capacidade Emulsificante (CE) para proteínas do soro obtidas de leite desnatado processado por HUAP.

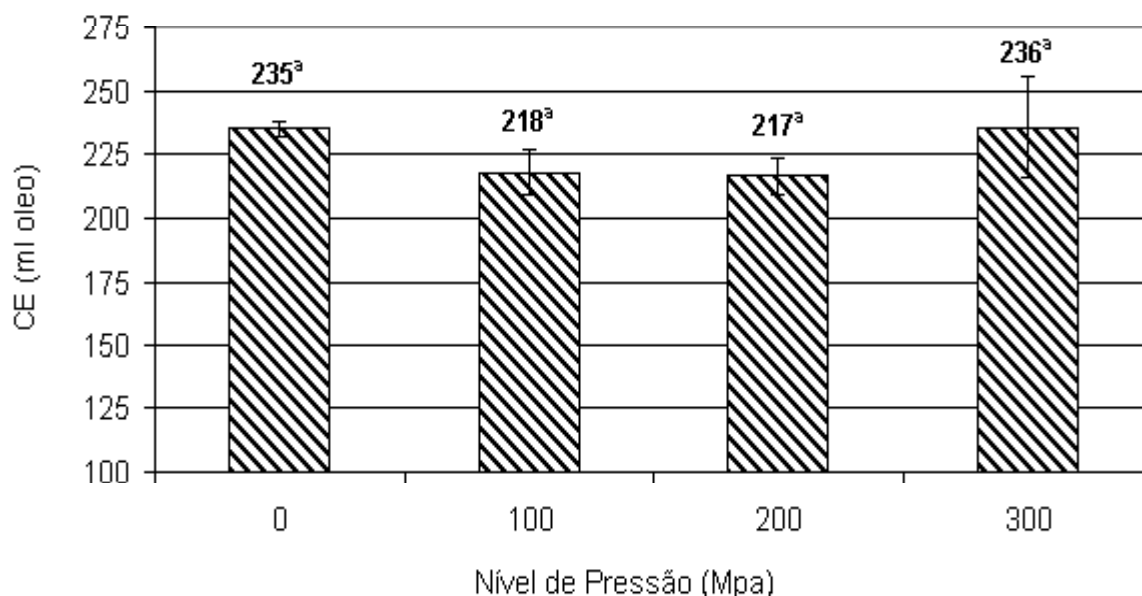


Figura 3.5: Capacidade Emulsificante (CE) de proteínas de soro obtidas de leite desnatado processado em HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

A Figura 3.6 a Estabilidade de Emulsão (EEm) de proteínas do soro obtidas a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

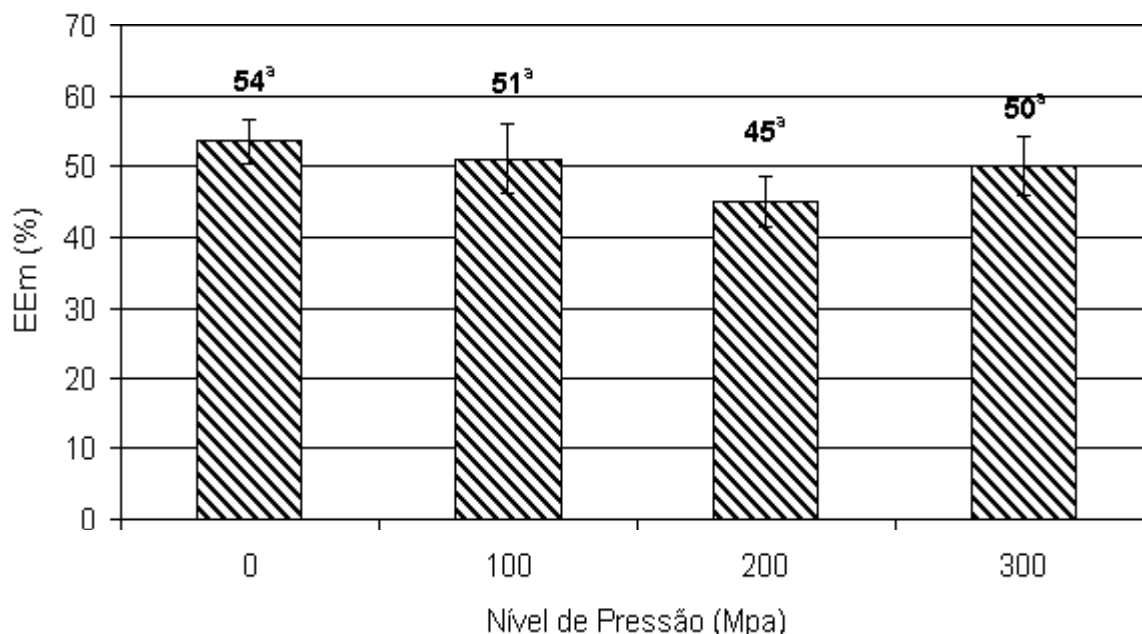


Figura 3.6: Estabilidade da Emulsão (EEm) de proteínas de soro obtidas de leite desnatado processado em HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

Não houve alteração estatisticamente significativa na Capacidade Emulsificante e na Estabilidade das Emulsões para nenhuma das proteínas submetidas a diferentes níveis de processamento de HUAP.

Alguns trabalhos foram realizados com emulsões e tratamentos HUAP, mas a maior parte deles estuda a homogeneização da emulsão já formada. FLOURY et al. (2002) utilizaram proteínas de soja para estabilizar a emulsão, e não encontraram variação na estabilidade da emulsão, mesmo tendo notado desnaturação da proteína durante o processamento. Os resultados do presente estudo são coerentes com os achados de FLOURY et al. (2002) e não foi notada nenhuma diferença entre os produtos.

Utilizando alta pressão isostática GALAZKA et al. (1995, 1996 e 1999) verificaram diminuição na capacidade emulsificante de concentrado proteico de soro, β -lactoglobulina e proteínas globulares de Vicia Faba (11S). Quanto maior a pressão maior foi diminuição da capacidade de emulsificação. Esta perda foi causada devido a agregação das proteínas desnaturadas no tratamento, e possivelmente também devido a formação de pontes dissulfeto entre as moléculas, o diminui a capacidade de recobrir as gotas de óleo da emulsão.

Quanto à estabilidade das mesmas emulsões, GALAZKA et al. (1995, 1996 e 1999) reportaram comportamentos distintos entre as diferentes proteínas analisadas. O concentrado proteico não apresentou diferença significativa de comportamento, enquanto que β -lactoglobulina e globulina 11S apresentaram sensível diminuição da estabilidade da emulsão com o aumento da pressão. Esta diferença deve estar relacionada com o efeito emulsificante de outras frações proteicas do soro (α -lactoalbumina e BSA) que sabidamente são mais resistentes a desnaturação pelo tratamento de alta pressão.

PITTIA et al. (1996) também constataram diminuição na capacidade emulsificante de soluções de β -lactoglobulina tratadas entre 300 MPa e 900 MPa. Porém não constataram alteração na estabilidade da emulsão. Relacionaram a diminuição à maior exposição dos sítios hidrofóbicos com posterior formação de agregados, o que dificulta a interação com as moléculas de óleo.

Baseados em método de absorbância, MOLINA et al. (2001) não encontraram alteração na estabilidade da emulsão de proteínas de soja para tratamentos de alta pressão variando entre 200 MPa e 600 MPa.

É importante ressaltar que os mesmos fatores envolvidos na melhora das propriedades de aeração não influenciaram as características de emulsificação, como esperado. Possivelmente essa diferença exista devido às características do meio, ou seja, as alterações de tamanho de partículas e de aumento de hidrofobicidade são efetivas em meio aquoso mas menos efetivas em óleo. Possivelmente as moléculas tenham um acesso mais fácil a interface ar-água que em óleo-água.

A Figura 3.7 apresenta o Índice de Atividade Emulsificante (IAE). Os dados foram obtidos em quintuplicata de análise para proteínas de soro obtidas a partir de 3 processos realizados com matérias-primas obtidas em dias distintos.

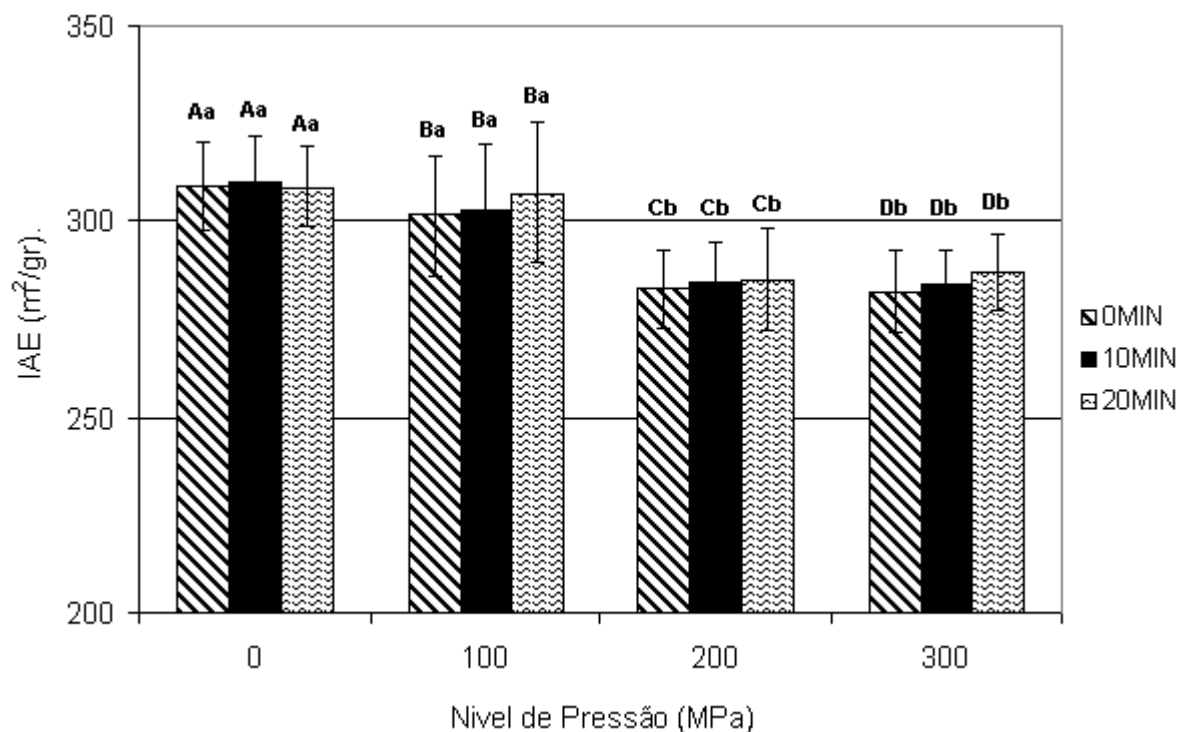


Figura 3.7: Índice de Atividade Emulsificante (IAE) de proteínas do soro liofilizadas obtidas a partir de leite desnatado processado em HUAP

* Média \pm Desvio Padrão, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey a 5% de significância.

** Letras maiúsculas comparam medidas na mesma pressão e letras minúsculas comparam medidas no mesmo tempo.

O IAE das amostras não varia com o tempo para todos os níveis de tratamento avaliados. Por outro lado houve diminuição estatisticamente significativa no IAE para os tratamentos de 200 MPa e 300 MPa em qualquer tempo avaliado.

Nota-se uma boa correlação entre as medidas de estabilidade de emulsão e índice de atividade emulsificante. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre as pressões de 0 MPa e 100 MPa com 200 MPa e 300 MPa no teste de estabilidade de emulsão, os resultados de 200 MPa e 300 MPa foram menores, em acordo com a avaliação de IAE, onde houve diferença estatisticamente significativa.

Não foi encontrado nenhum dado na literatura pesquisada avaliando índice de atividade emulsificante de proteínas de soro submetidas a tratamento de alta pressão isostática e HUAP.

4. Conclusões

O processamento de homogeneização de ultra alta pressão é um tratamento capaz de gerar alterações físico-químicas e funcionais em proteínas do soro de leite. Estas alterações estruturais se refletem em propriedades funcionais diferenciadas e podem, portanto, originar ingredientes com funcionalidade diferenciada.

O concentrado proteico do soro obtido por acidificação de leite tratado em homogeneização a ultra alta pressão pode ter sua composição centesimal alterada, provavelmente devido a matriz proteica formada durante a acidificação e a sua capacidade em reter mais ou menos gordura e água.

A maior parte das alterações é dependente do nível do tratamento.

O aumento da hidrofobicidade de leites tratados em HUAP, e que é associada em parte à desnaturação de proteína de soro, pode ser a causa da alteração notada na solubilidade das proteínas de soro obtidas de leite homogeneizado a 100 MPa e 200 MPa. O maior número de sítios hidrofóbicos em exposição pode tornar mais difícil a solubilização das moléculas.

Já a melhora das características de aeração aparentemente está associada à maior exposição de sítios hidrofóbicos, e também à diminuição do tamanho das partículas. Estes dois fatores facilitam a adsorção das moléculas na interface ar-água, e permitem que as moléculas interajam e formem um filme mais flexível e resistente. Conseqüentemente ocorre o aumento da capacidade de formação de espuma e da estabilidade de espuma, sendo que estes efeitos foram mais intensos quanto mais intensa foi a pressão aplicada.

Finalmente com relação às propriedades de emulsificação não houve nenhuma alteração na performance das proteínas de soro. Provavelmente o meio óleo não é muito propício para que as mudanças estruturais sejam notadas na interface óleo-água.

No caso da medição do Índice de atividade emulsificante, houve correlação entre os resultados obtidos com os resultados de estabilidade de emulsão.

Finalmente é importante destacar que na literatura a avaliação do efeito do tratamento de alta pressão sobre as proteínas e sua funcionalidade é em geral realizada sob uma lógica diferente. Em geral se usam isolados proteicos comerciais e submetem-se as soluções puras destas proteínas a alta pressão, e portanto, não consideram possíveis interações entre as frações caseína e proteínas do soro.

5. Referências Bibliográficas

- ACTON, J. C.; SAFFLE, R. L. Stability of oil-in-water emulsions. 1 – Effect of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**, v. 35, n. 1, p. 852-855, 1970.
- ANEMA, S. G.; MCKENNA, A. B. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, p.422-428, 1996.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. 13rd.ed. Washington, D. C., 1980.
- BIKKER, J. F.; ANEMA, S. G.; LI, Y.; HILL, J. P. Thermal denaturation of β -lactoglobulin in heated skim milk. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 11, p. 609-613, 2000.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BOUAOUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v.16, p. 275-284, 2006.
- De KANTEREWICZ, R. J.; ELIZALDE, B. E.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Water-Oil Absorption Index (WOAI): A simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 5, p. 1381-1383, 1987.
- ELIZALDE, B. E.; GIACCAGLIA, D.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Kinetics Of Liquid Drainage From Protein-Stabilized Foams. **Journal Of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 24-30, 1991.
- FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LEGRAND, J. Effect of ultra high pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein stabilized emulsions. **Journal of Food Science**, v.67, n. 9, p.3388–3395, 2002.
- FOX, P. F. & McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: FOX, P. F. **Dairy chemistry and Biochemistry**. (Ed). London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 147-238.
- GALAZKA, V. B.; LEDWARD, D. A.; DICKINSON, E.; LANGLEY, K. R.; High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1341-1343, 1995.

- GALAZKA, V. B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D. A. Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 2, p. 213-219, 1996.
- GALAZKA, V. B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D. A.; Emulsifying behavior of 11S globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: comparison of thermal and high-pressure treatments. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 5, p. 425-435, 1999.
- GALAZKA, V. B.; DICKINSON, E.; LEDWARD, D. A. Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 5, p. 182-187, 2000.
- GOMES, F. P. Curso de Estatística Experimental. 10 ed, São Paulo: Nobel. 430p. 1982.
- GUERZONI, M. E.; VANININI, L.; CHAVES LOPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GIANOTTI, A. Effect of high pressure homogenisation on microbial and physico-chemical characteristics of goat cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 851-862, 1999.
- HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy research**, V.70, p.297-305, 2003.
- HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. **Journal of Dairy research**, V.72, p.25-33, 2005.
- IBANOGLU E.; KARATAS, S. High pressure effect on foaming behaviour of whey protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v.47, p.31-36, 2001.
- IBANOGLU, E. High pressure effect on foaming properties of blactoglobulin and dextran sulfate mixture. *Nahrung/Food* v.45, n.5, p.342-346, 2001.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Determination of the casein content of milk**. IDF Standard nº29, IDF, Brussels, Belgium, 1964.
- KESSLER, H. G.; BEYER, H. J. Thermal denaturation of whey protein and its effect in dairy technology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 3, p. 165-173, 1991.
- LOPEZ-FANDINO, R., CARRASCOSA, A. V., OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. **Journal of Dairy Science** v.79, p.924-936, 1996.

- LOPEZ-FANDINO, R. High pressure induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. **International Dairy Journal**, v. 16, p.1119-1131, 2006.
- McCRAE, C. H.; LAW, A. J. R.; LEAVER, J. Emulsification properties of whey protein in their natural environment: effect of whey protein concentration at 4 and 18 milk fat. **Food hydrocolloids**, v. 13, p. 389-399, 1999.
- MCELWAIN, M. D.; RICHARDSON, T.; AMUDSON, C. H.; Some functional properties of succinylated single cell protein concentrate. **Journal of Milk Food Technology**, v. 38, n. 9, p. 521-526, 1975.
- MOHANTY, B.; MULVIHILL, D. M.; FOX, P. E. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. **Food Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 17-30, 1988.
- MOLINA, E.; PAPADOPOULOU, A.; LEDWARD, D. A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulin. **Food hydrocolloids** v.15, p.263-269, 2001.
- MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. P.; VAN-BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1715-1718, 1985.
- MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. Assessment of the functional properties of milk protein products. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 209, p. 3-11, 1983.
- PATEL, P. D.; STRIPP, A. M.; FRY, J. C. Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 57-63, 1988.
- PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.26, n.3, p.716-723, 1978.
- PHILLIPS, L. G.; GERMAN, J. B.; O'NEIL, T. E.; FOEGEDING, E. A.; HARWALKAR, V. A.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E.; MORR, C. V.; REGENSTEIN, J. M.; SMITH, D. M.; KINSELLA, J. E. Standardized procedure for measuring foaming properties of 3 proteins, a collaborative study. **Journal of Food Science** v.55, n.5, p.1441-1453, 1990.
- PITTIA, P.; WILDE, P. J.; HUSBAND, F. A.; CLARK, C. C. Functional and structural properties of β -lactoglobulin as affected by high pressure treatment. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1123-1128, 1996.

- ROMAN, J. A. **Propriedades físico-químicas, nutritivas e funcionais da caseína de leite bovino obtida por diferentes processos.** 2002. 163 p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais das proteínas e alimentos proteicos. In: SGARBIERI, V. C. (Ed). **Proteínas em Alimentos Proteicos.** Campinas: Ed Varela, 1996. p. 259-271.
- SUBIRADE, M.; LOUPIL, F.; ALLAIN, A. F.; PAQUIN, P. Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of β -lactoglobulin and on its conformational properties as determined by fourier transform infrared spectroscopy. **International Dairy Journal**, v.8, p.135-140, 1998.

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

O processamento de leite por Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) foi capaz de proporcionar alterações nas frações proteicas do mesmo, alterando suas propriedades funcionais. Esta tecnologia mostrou-se potencialmente capaz de produzir, a partir de leite fluido, novos ingredientes com performance nova e diferenciada.

A maior parte das alterações foi dependente do nível do tratamento. Quanto maior o nível de tratamento, maior o efeito e o impacto na estrutura das micelas de caseína e proteínas do soro.

O tratamento de homogeneização a alta pressão entre os níveis de 0 e 300 MPa não causou alteração no pH do leite. Além disso, manteve inalterada ou aumentou estabilidade das proteínas frente à precipitação com álcool, permitindo sua utilização em processo térmicos posteriores.

A HUAP aumentou a viscosidade do leite tratado em 300 MPa; aumentou a luminosidade em níveis de 100 MPa e 200 MPa; aumentou progressivamente a hidrofobicidade com o aumento da pressão aplicada; e causou a desnaturação de proteínas de soro em 200 MPa e 300 MPa.

As proteínas obtidas e isoladas a partir de leite processado por HUAP apresentaram alterações em suas propriedades funcionais (solubilidade, aeração e emulsificação). As alterações foram dependentes do nível de tratamento.

A solubilidade da caseína processada por HUAP entre os níveis de 0 e 300 MPa não sofreu alteração em nenhum nível de pH avaliado (3.5 – 5.0 – 6.5). Entretanto as proteínas de soro obtidas de leite tratado em 100 MPa e 200 MPa apresentaram diminuição de sua solubilidade nos pHs 3.5 e 5.0, mas nenhuma alteração no pH 6.5.

Com relação às propriedades de aeração a HUAP, nenhum nível de pressão alterou a capacidade de formação de espuma da caseína, entretanto a 300 MPa houve aumento na estabilidade da espuma formada. Já as proteínas de soro obtidas de leite processado a 300 MPa apresentaram aumento tanto na capacidade de formação de espuma quanto na estabilidade da espuma formada.

O tratamento entre os níveis de 0 MPa a 300 MPa causou ainda aumento progressivo na capacidade emulsificante e na estabilidade da emulsão da caseína. Enquanto que as proteínas de soro obtidas do leite procesado a 300 MPa também demonstraram aumento na capacidade emulsificante, porém nenhuma alteração na estabilidade da emulsão.